

麻类脱胶高效菌株果胶裂解酶基因克隆与表达

成莉凤 刘正初* 段盛文 冯湘沅 郑科 郑霞 程毅

(中国农业科学院麻类研究所 湖南 长沙 410205)

摘要:【目的】克隆麻类脱胶高效菌株 *Dickeya* sp. DCE-01 的果胶裂解酶基因并进行原核表达, 对表达产物进行纯化和酶学性质研究。【方法】根据该菌株全基因组序列预测的果胶裂解酶基因 Q59419 设计引物, PCR 扩增后将该基因连接到 pEASY-E1 和 pACYCDuet-1 载体上, 导入 *E. coli* BL21(DE3) 进行表达。选择酶活力高的阳性克隆子进行大量诱导表达后, 采用超滤和 Sephadex G-100 凝胶层析两步法纯化出果胶裂解酶, 研究其酶学性质。【结果】克隆到果胶裂解酶基因 *pel* (GenBank 登录号: JX964997), 其序列全长 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸。pACYCDuet-1-*pel*-BL 表达胞外果胶裂解酶活力最高, 发酵液粗酶活达 298.8 IU/mL。其最适反应温度为 50 °C, 最适 pH 为 9.0; 保温 1 h, 酶活稳定温度 ≤ 45 °C, 稳定 pH 为 9.0–10.0。酶催化作用依赖于 Ca^{2+} , 其最适作用浓度为 2 mmol/L; Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 NH_4^+ 促进酶活力, Fe^{3+} 和 Pb^{2+} 严重抑制酶活力; 聚半乳糖醛酸钠为该酶的最适底物。【结论】从麻类脱胶高效菌株中发掘到碱性果胶裂解酶基因, 其表达产物在生物质加工过程中具有重要工业化应用前景。

关键词: 麻类脱胶, 高效菌株, 果胶裂解酶, 基因克隆, 酶学性质

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z249); 国家麻类产业技术体系建设专项项目(No. CARS-19-E24)

*通讯作者: Tel: 86-731-88998535; Fax: 86-731-88998528; ✉: ibfclzc@189.cn

收稿日期: 2012-10-31; 接受日期: 2012-12-06

Cloning and expression of a pectate lyase gene from an efficient strain for bast fiber bio-extracting

CHENG Li-Feng LIU Zheng-Chu* DUAN Sheng-Wen FENG Xiang-Yuan
ZHENG Ke ZHENG Xia CHENG Yi

(Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: [Objective] We cloned and expressed the pectate lyase gene (*pel*) from *Dickeya* sp. DCE-01, a strain for bast fiber bio-extracting, in *E. coli* BL21(DE3). Then we characterized the purified pectate lyase (Pel). **[Methods]** Primers were designed by the potential *pel* Q59419 annotated from the whole genome sequence of *Dickeya* sp. DCE-01. The *pel* was cloned, linked to pEASY-E1 and pACYCDuet-1, and expressed in *E. coli* BL21(DE3). After comparing the activities of extracellular Pel from the engineering strains, the Pel with highest activity was purified by the two-step process involving ultrafiltration and gel filtration (Sephadex G-100) and then characterized. **[Results]** The *pel* (GenBank: JX964997) was 1 128 bp and encoded 375 amino acids. The highest activity of the extracellular Pel from pACYCDuet-1-*pel*-BL strain was 298.8 IU/mL. The optimal condition for the purified enzyme was at 50 °C, pH 9.0 and polygalacturonic acid sodium as a substrate. The catalytic activity of the purified Pel was stable below 45 °C for 1 h at pH 9.0–10.0. It was dependent on Ca^{2+} , while it was promoted by Zn^{2+} and NH_4^+ and inhibited seriously by Fe^{3+} and Pb^{2+} . The maximal activity of the purified enzyme was obtained at Ca^{2+} concentration of 2 mmol/L. **[Conclusion]** An efficient alkaline pectate lyase gene has been excavated from strain DCE-01, and its expression product may be available for biorefinery.

Keywords: Bast fiber bio-extracting, Efficient strain, Pectate lyase, Gene clone, Enzymatic property

果胶分子由不同酯化程度的半乳糖醛酸以 α -1,4 糖苷键聚合而成, 在植物组织中与纤维素、半纤维素、木质素和蛋白质等相互交联, 维持细胞、组织结构的固有形态, 侧链常带有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖、木糖、海藻糖、芹菜糖等, 游离的羧基部分或全部与钙、钾、钠离子, 特别是与硼化合物结合在一起^[1]。果胶彻底降解需要一系列的酶协同作用。根据酶的作用底物和作用方

式不同, 分为三大类: 果胶裂解酶、果胶酯酶、果胶水解酶。

果胶裂解酶(Pectate lyase, EC 4.2.2.2)通过反式消去作用以随机方式切割果胶酸或果胶的 α -1,4-糖苷键, 生成 C_4 - C_5 不饱和寡聚半乳糖醛酸。其最适 pH 一般在碱性范围, 催化作用依赖于 Ca^{2+} ^[2]。目前已被广泛应用于造纸行业^[3]、食品加工^[4]、环境保护^[5]、纺织行业^[6]等。

国内外有关麻类生物脱胶的微生物菌种报道很多, *Bacillus pumilus* DKS1^[7]、*Pseudozyma* sp. SPJ^[8]、*Bacillus* sp. NT-39^[9]等。近年来, 随着基因工程和蛋白质技术的发展, 有关麻类生物脱胶的果胶裂解酶基因克隆、表达及功能研究的报道出现。Yuan 等^[10]从 *Streptomyces* sp. S27 菌株克隆了果胶裂解酶基因, 证明其编码的果胶裂解酶对黄麻生物脱胶效果显著。Basu 等^[11]从苧麻生物脱胶菌株 *B. pumilus* DKS1 克隆了果胶裂解酶基因, 并进行原核表达和酶学性质研究, 该果胶裂解酶分子量为 35 kD, 最适温度为 60 °C, 最适 pH 为 8.5–9.0, Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 均能促进酶活力, Zn^{2+} 和 EDTA 严重抑制酶活力。有关麻类生物脱胶的 *Dickeya* sp. 菌株未见报道。

中国农业科学院麻类研究所工程酶项目组选育到麻类脱胶高效菌株 *Dickeya* sp. DCE-01, 它能在 6 h 内独立完成苧麻脱胶。在项目组已对该菌株进行全基因组 DNA 测序及基因功能注释(尚未公开)的基础上, 本研究根据该菌株基因组序列预测的果胶裂解酶基因 Q59419 设计引物, 克隆果胶裂解酶基因, 构建原核表达体系进行诱导表达, 对表达产物进行纯化和酶学性质研究, 为进一步阐明麻类生物脱胶机理、加速果胶裂解酶的工业化应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体

Dickeya sp. DCE-01 菌株由中国农业科学院麻类研究所工程酶项目组分离与保存。*E. coli* BL21(DE3) 菌株、pACYCDuet-1 质粒购自 Novagen 公司。pEASY-E1 购自 TransGen 公司。

1.2 主要试剂

聚半乳糖醛酸钠(No. P3850)、橘子果胶(No. P9135)、苹果果胶(No. P8471)购自 Sigma 公司, 高保真聚合酶 KOD plus ver 2.0、*Sac* I、*Xho* I、

Bgl II、*rTaq*、dNTPs 购自 TOYOBO 公司, DNA Marker III 购自 Tiangen 公司, 蛋白质 Marker (No. SM0671) 购自 Fermentas 公司, Sephadex G-100 (超细) 购自 Pharmacia 公司, 其他常规试剂均为分析纯的商业化试剂。

1.3 培养基

改良肉汤培养基^[12]、LB 培养基^[13]。

1.4 菌种培养

Dickeya sp. DCE-01 菌种的活化程序: 从本项目组保存的斜面保藏菌挑取一环 *Dickeya* sp. DCE-01 菌种接种至 5 mL 改良肉汤培养基, 充分悬匀, 35 °C 静置培养 5–6 h。稀释涂改良肉汤培养基平板, 35 °C 静置培养 18–20 h, 分离单菌落。挑选典型菌落接种于 5 mL LB 培养基, 35 °C、180 r/min 培养过夜, 供基因组 DNA 提取或其他用途。

基因工程菌的活化程序: 取–80 °C, 甘油保存的基因工程菌 50 μL 接种至 5 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素或 50 mg/L 氯霉素的 LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜, 供质粒 DNA 提取或其他用途。

基因工程菌的诱导产酶: 挑选 *pel* 基因插入正确的转化子接种到含 100 mg/L 氨苄青霉素或 50 mg/L 氯霉素的 5 mL LB 培养基, 37 °C、220 r/min 培养过夜。取 0.5 mL 菌液接种到含 100 mg/L 氨苄青霉素或 50 mg/L 氯霉素的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养。当 OD_{600} 达到 0.6 左右, 添加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30 °C、120 r/min 诱导 21 h。

1.5 基因组 DNA 的提取

取扩大培养的 *Dickeya* sp. DCE-01 菌液 5 mL, 5 000 r/min 离心 10 min, 去上清, 沉淀加 9.5 mL TE 悬浮, 并加 0.5 mL 10% SDS 和 50 μL 20 g/L 蛋白酶 K, 混匀, 37 °C 保温 1 h。加 1.5 mL 5 mol/L NaCl 混匀。加 1.5 mL CTAB/NaCl 溶液, 65 °C 保

温 20 min。用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1, *V/V/V*)抽提。然后用等体积氯仿:异戊醇(24:1, *V/V*)抽提, 取上清至干净管中。加一倍体积的异丙醇, 颠倒混匀, 室温下静置 10 min, 保证 DNA 完全沉淀。用玻璃棒捞出 DNA 沉淀, 70%乙醇漂洗后, 吸干, 溶于 1 mL TE 中, 紫外与电泳检测质量。如存在 RNA, 可以用适量 RNase 处理后, -20 °C 保存。

1.6 *pel* 基因的扩增

根据 *Dickeya* sp. DCE-01 基因组 DNA 序列预测的果胶裂解酶基因 Q59419 设计特异引物扩增开放阅读框。针对载体 pEASY-E1 的正向引物 F1: 5'-TCGAGCTCCATGAAATCACTCATTACC CCGAT-3' (*Sac* I 酶切位点), 反向引物 R1: 5'-TTATGCGGCCGCTTATTTACAGGCTGCGCT GG-3' (*Not* I 酶切位点)。针对载体 pACYCDuet-1 的正向引物 F2: 5'-GGAAGATCTCATGAAATCA CTCATTACC-3' (*Bgl* II 酶切位点), 反向引物 R2: 5'-CCGCTCGAGTTATTTACAGGCTG-3' (*Xho* I 酶切位点)。由上海生工合成。

以 *Dickeya* sp. DCE-01 菌株基因组 DNA 为模板, 分别用 F1-R1、F2-R2 两对引物扩增 Q59419 基因, 其产物暂定名为 *pel*-1 和 *pel*-2。扩增体系

参照 KOD 试剂盒说明书。扩增条件: 95 °C 4 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。

1.7 表达体系的构建

对 *pel*-1 PCR 产物进行加 A 处理。加 A 反应体系为: 10×Buffer 2 μL, *rTaq* 酶 0.5 μL, dNTPs (10 mmol/L) 3 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1 μL, PCR 产物 13.5 μL。72 °C 保温 30 min, 回收 *pel*-1 加 A 产物后, 与 pEASY-E1 进行连接(图 1A), 导入到 *E. coli* BL21(DE3), 通过含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 平板对重组子进行筛选。

对 *pel*-2 PCR 产物回收后, 直接进行双酶切。酶切体系为: 10×Buffer 2 μL, *Xho* I 0.5 μL、*Bgl* II 0.5 μL, PCR 产物 17 μL。37 °C 保温 4 h, 回收 *pel*-2 酶切产物后, 与经过 *Xho* I 和 *Bgl* II 酶切的 pACYCDuet-1 进行连接(图 1B), 导入到 *E. coli* BL21(DE3), 通过含有 50 mg/L 氯霉素的 LB 平板对重组子进行筛选。基因工程常规操作按照《分子克隆实验指南》第 3 版^[13]进行。

1.8 果胶裂解酶活力测定

果胶裂解酶活力测定: 参照 Roy 方法进行^[14]。

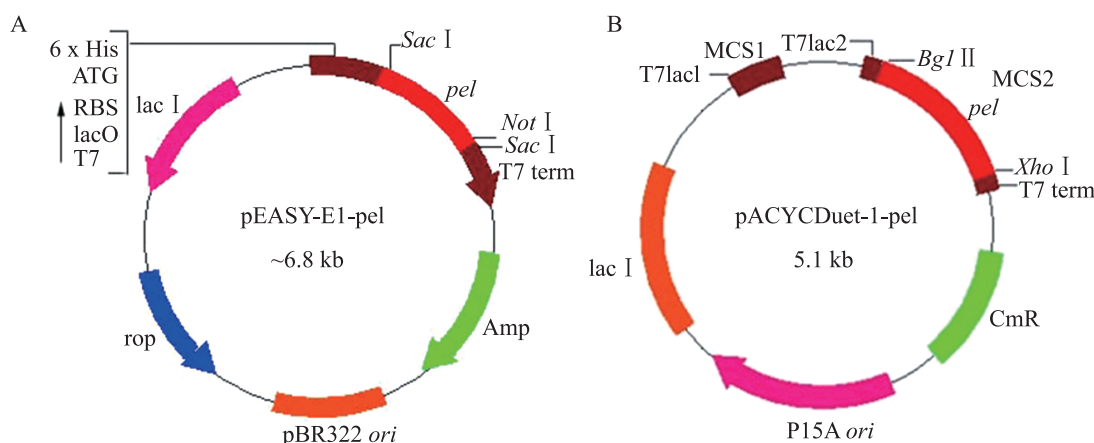


图 1 重组表达质粒的物理图谱

Fig. 1 Physical map of the recombinant expression plasmids

用 pH 9.0、0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配置 5 g/L 的聚半乳糖醛酸钠溶液。取 2 mL 底物预热到 50 °C, 添加 1 mL 适当稀释倍数的酶液和 6 μ L 1 mol/L CaCl_2 溶液, 充分混匀, 50 °C 准确反应 10 min, 煮沸灭活。用沸水浴充分灭活的酶液, 作相同反应处理的溶液为对照, 测定 OD_{235} 。果胶裂解酶定义为: 底物每分钟释放出相当于 1 μ mol 不饱和半乳糖醛酸苷所需的酶量为 1 个酶活力单位(以 IU 表示), 235 nm 波长下消光系数为 4 600 ($\text{cm}\cdot\text{L}/\text{mol}$)。

1.9 果胶裂解酶的纯化

取诱导成熟的发酵液 1 000 mL, 采用切向流超滤装置(Sartorius, 德国)浓缩、分离粗酶液, 收集 10–100 kD 的组分 8 mL, 供层析上样用。

将充分溶胀的 Sephadex G-100 预先装好层析柱(规格: $\text{O}16\text{ mm}\times1\text{ 000 mm}$)。取超滤浓缩粗酶液 4 mL 上样, 用 pH 9.0 0.05 mol/L 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液洗脱(流速: 0.5 mL/min), 按 5 mL/管收集样品。采用标准方法测定果胶裂解酶活力, 采用 BCA 法测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。以组分编号为横坐标, 果胶裂解酶活力和蛋白质含量为纵坐标绘制凝胶层析洗脱曲线。

取酶活力和蛋白质峰重叠的收集液, 在 4 °C 条件下进行透析 48 h, 用聚乙二醇 20000 浓缩, SDS-PAGE 检测纯化效果。

1.10 SDS-PAGE 电泳

参照 Laemmli 等的方法进行^[15]。浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 考马斯亮蓝 R250 染色显示蛋白带。蛋白预染 Marker 与样品在同一条件下电泳。以蛋白质分子量的对数为纵坐标, 相对迁移率为横坐标作图, 计算目标蛋白的表观分子量。蛋白质分子量标准依次为: 170、130、95、72、55、43、34、26、17、10 kD。

1.11 酶学性质

最适酶促反应温度及 pH 测定: 相同的反应

体系至于不同的温度梯度(35 °C–75 °C)反应, 其他条件按标准方法测定酶活力。用不同 pH 梯度的缓冲溶液(pH 8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸, pH 8.5–10.5 Gly-NaOH, pH 11.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$)配制底物, 其他条件按标准方法测定酶活力。

热稳定性及 pH 稳定性测定: 热稳定性实验中, 将纯酶置于各温度梯度(30 °C–70 °C)保温 60 min, 按标准方法测定残余酶活力。pH 稳定性实验中将纯酶置于各 pH 梯度的缓冲液(pH 3.0–8.0 磷酸氢二钠-柠檬酸, pH 8.5–10.5 Gly-NaOH, pH 11.0–12.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$) 4 °C 放置 60 min, 按标准酶活力测定方法测定残余酶活力。

金属离子对酶活力的影响: 将纯酶分别添加 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Ni^{2+} 、 NH_4^{+} 和 Cu^{2+} 至终浓度 1 mmol/L, 4 °C 放置 60 min, 按标准酶活力测定方法测定残余酶活力。

对不同底物的亲和力: 分别以聚半乳糖醛酸钠、苹果果胶、橘子果胶配制 1–10 g/L 溶液, 以不同浓度的底物测定果胶裂解酶活力。以 $1/[S]$ 为横坐标, $1/v$ 为纵坐标作图, Lineweaver-Burk 双倒作图法计算 K_m 值和 V_m 值^[16]。

2 结果与分析

2.1 重组子构建

以 *Dickeya* sp. DCE-01 菌株基因组 DNA 为模板, 用 F1-R1、F2-R2 两对引物扩增目的基因, 其产物分别命名为 *pel-1* 和 *pel-2*。经 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 目的基因片段大小接近 1.2 kb (图 2, 泳道 1 和 2), 与预期片段 Q59419 大小(1 128 bp)相符。

采用 *Sac* I 单酶切和菌落 PCR 扩增方法对阳性克隆子 pEASY-E1-*pel-1* 插入的目的基因片段同时进行检测, 其大小均接近 1.2 kb (图2, 泳道 3 和 4), 即两种方法均验证其插入片段正确。

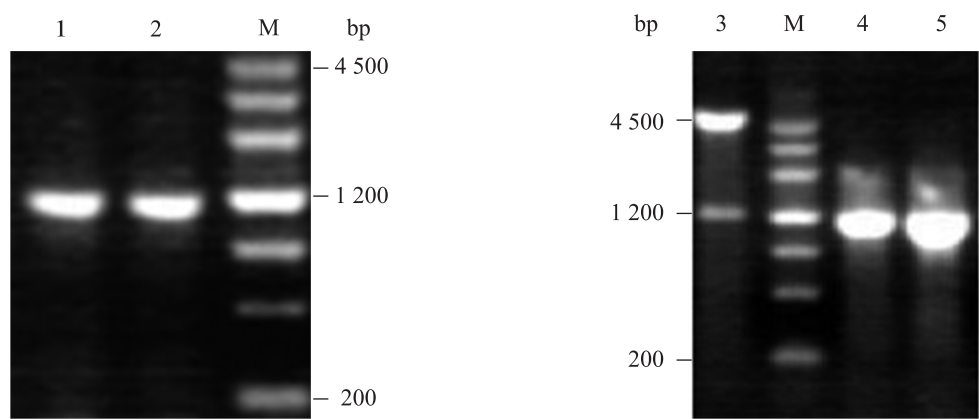


图 2 *pel* 基因 PCR 扩增与重组子构建

Fig. 2 Amplification of *pel* gene and construction of recombinants

注: 1, 2: PCR 扩增产物 *pel*-1 和 *pel*-2; 3: pEASY-E1-*pel* *Sac* I 酶切; 4: pEASY-E1-*pel*-BL 菌落 PCR; 5: pACYCDuet-1-*pel*-BL 菌落 PCR; M: DNA marker Ⅲ.

Note: 1, 2: *pel*-1 and *pel*-2 amplified by PCR; 3: pEASY-E1-*pel* digested by *Sac* I ; 4: PCR of pEASY-E1-*pel*-BL; 5: PCR of pACYCDuet-1-*pel*-BL; M: DNA marker Ⅲ.

采用菌落 PCR 方法对阳性克隆子 pACYCDuet-1-*pel*-2 进行验证, 其扩增的条带大小与预期大小(1.2 kb)一致(图 2, 泳道 5)。

将验证后的两种重组子进行测序, 获得相同的 *pel* 基因序列(GenBank 登录号: JX964997), 与 *Dickeya* sp. DCE-01 基因组序列预测到的 *pel* Q59419 完全一致。全长 1 128 bp, 编码 375 个氨基酸。前导蛋白分子量为 39.8 kD, 成熟蛋白分子

量为 37.6 kD; pI 为 6.8。Interproscan 分析, 该酶属于 PF00544 家族。将蛋白序列进行 BLASTp 比对, 该酶含有 Pectate lyase C 结构域, 与 *Pectobacterium* sp.、*Dickeya* sp.、*Erwinia* sp.等亲缘关系接近的果胶裂解酶一致性大于 90%, 与 *Bacillus* sp.、*Streptomyces* sp.、*Actinoplanes* sp.等亲缘关系较远的果胶裂解酶一致性为 30%–40% (表 1)。

表 1 与部分微生物来源的果胶裂解酶相似性比较
Table 1 Similarity of Pels from partial microorganism

蛋白质序列号 Accession number of protein	菌株来源 Scource of strain	一致性 Identity (%)
ACL81179.1	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	99
YP003335324.1	<i>Dickeya dadantii</i> Ech586	95
YP003884901.1	<i>Dickeya dadantii</i> 3937	98
CAA47821.1	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	97
ZP09013911.1	<i>Brenneria</i> sp. EniD312	79
ZP10133329.1	<i>Cellvibrio</i> sp. BR	59
ZP09856808.1	<i>Xanthomonas sacchari</i> NCPPB 4393	43
YP0068233857.1	<i>Alteromonas macleodii</i> ATCC 27126	32
YP005462123.1	<i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	33
BAA76884.1	<i>Bacillus</i> sp.	33
ZP08804546.1	<i>Streptomyces zinciresistens</i> K42	32
YP005462260.1	<i>Actinoplanes missouriensis</i> 431	32

与 *Dickeya dadantii* 3937 (*Dickeya* 属的模式菌株) 的 PelB 蛋白序列(GenBank 登录号: YP003884901.1)比对有 8 个氨基酸存在差异(图 3): 在第 37、227、355、363、365 这 5 个位点上存在氨基酸种类完全不同的区别, 在第 155、165、220 这 3 个位点上存在氨基酸结构类似的区别。至于这些差异是否影响到酶的功能, 有待进一步研究。

2.2 果胶裂解酶的诱导

取成熟的发酵液, 测定胞外果胶裂解酶活力

(表 2)。由表 2 可知, 在碱性条件下, pACY-CDuet-1-*pel*-BL 测得的果胶裂解酶活力最高, 为 298.8 IU/mL, 比酶活力为 1 992.5 IU/mg, 是 *Bacillis subtillus* (重组酶 142 IU/mL)的 2 倍以上。

2.3 果胶裂解酶的纯化

取 pACYCDuet-1-*pel*-BL 的成熟发酵液, 经超滤浓缩后, Sephadex G-100 凝胶层析分离(图 4), 取第 23 和 24 管收集液在 4 ℃ 条件下透析 48 h, 用聚乙二醇 2 万浓缩, SDS-PAGE 检测纯酶(图 5)。

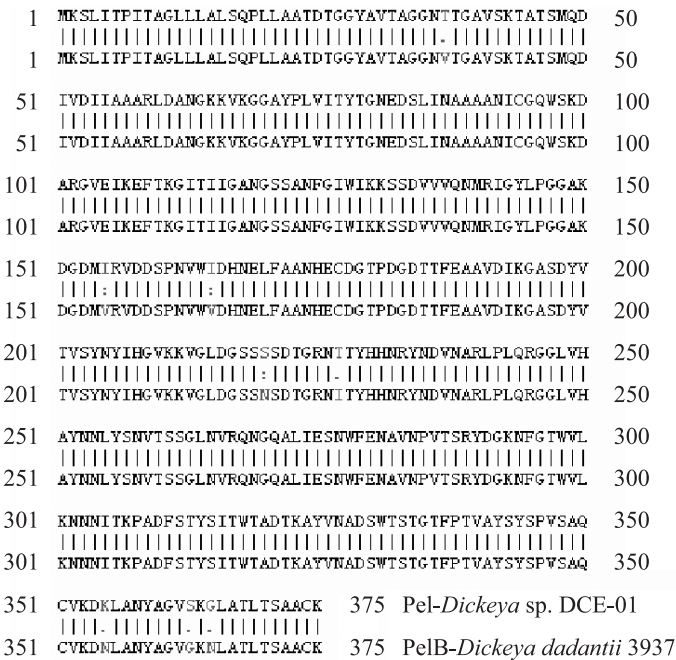


图 3 *Dickeya dadantii* 3937 和 *Dickeya* sp. DCE-01 的 Pel 蛋白序列比对
Fig. 3 Alignment of Pels from *Dickeya dadantii* 3937 and *Dickeya* sp. DCE-01

表 2 基因工程菌与原始菌的果胶裂解酶活力比较		
Table 2 Comparison of Pel activity from genetic engineering strains and original strain		
菌株 Strain	酶活力 Pel activity (IU/mL)	比酶活力 Specific Pel activity (IU/mg)
<i>Dickeya</i> sp. DCE-01	12.4±0.5	82.8±1.7
pEASY-E1- <i>pel</i> -BL	164.9±1.1	1 092.9±2.7
pACYCDuet-1- <i>pel</i> -BL	298.8±1.5	1 992.5±3.1

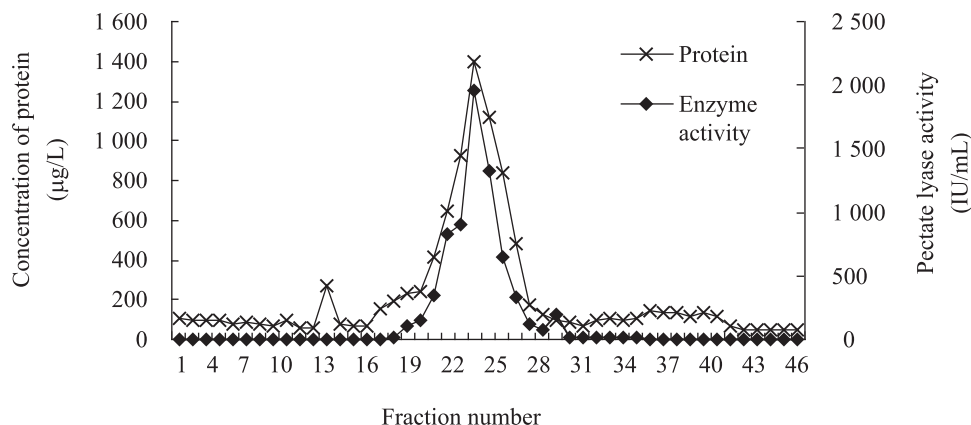


图4 Sephadex G-100 凝胶层析

Fig. 4 Sephadex G-100 gel chromatography

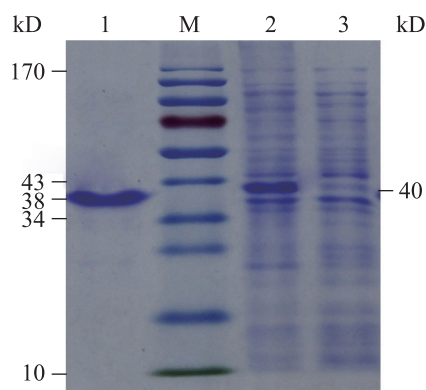


图5 果胶裂解酶表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of crude and purified Pels

注: 1: 纯酶; 2: pACYCDuet-1-*pel*-BL 全蛋白; 3: pACYCDuet-1-BL 全蛋白, 作阴性对照; M: 蛋白质分子量标准。

Note: 1: Purified pectate lyase; 2: Total protein of pACYCDuet-1-*pel*-BL; 3: Total protein of pACYCDuet-1-BL, negative control; M: Protein molecular weight ladders.

图5显示, 纯化样品(泳道1)只出现了一条蛋白质谱带, 计算其表观分子量为38 kD, 与预计的成熟蛋白质分子量(37.6 kD)一致。由此可见, 阳性克隆子发酵液经过超滤和Sephadex G-100凝胶层析两步法纯化即可获得电泳纯的单质酶。同时, 与阴性对照(泳道3)比较, 阳性克隆子的全蛋白里(泳道2)出现一条十分明显的蛋白质谱带, 计算其表观分子量接近40 kD, 与预计的前体蛋

白质分子量(39.8 kD)一致。这种分子量大小的差异可能与表达机制有关。

2.4 果胶裂解酶的酶学性质

纯化果胶裂解酶的酶学性质分析结果如图6、7和表3、4所示。不同温度条件下测定果胶酶活力, 相对酶活的峰值出现在50℃(图6A), 说明该酶最适反应温度为50℃。将该酶置于不同温度下孵育60 min后, 测定其残余酶活力的结果显示(图6B), 在30℃–45℃时, 残余酶活力在80%以上, 可以认为具有较好的热稳定性; 当保存温度提高至50℃以上, 该酶迅速失活。

不同pH条件下测定果胶酶活力的结果显示, 其最适反应pH为9.0(图6C), 稳定pH为9.0–10.0(图6D)。因此, 根据酶学性质理论, 可以肯定该酶属于碱性果胶裂解酶。

在1 mmol/L浓度下, 金属离子对酶活力的影响如表3所示, Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 NH_4^+ 促进酶活力, Fe^{3+} 和 Pb^{2+} 严重抑制酶活力, Ni^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 和 Cu^{2+} 无明显作用。

在不同的 Ca^{2+} 浓度下, 测得的果胶裂解酶活力如图7所示。该果胶裂解酶的最适 Ca^{2+} 浓度为2 mmol/L。

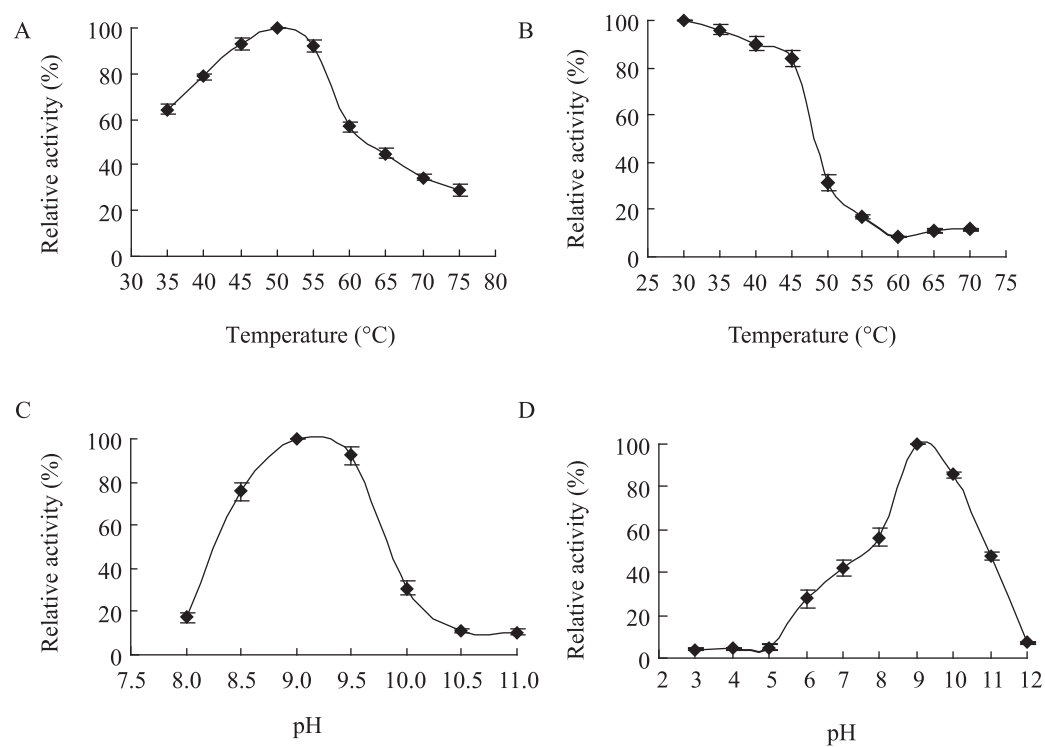


图 6 温度和 pH 对果胶裂解酶活力的影响

Fig. 6 Effect of temperature and pH on Pel activity

注: A: 最适温度曲线; B: 稳定温度曲线; C: 最适 pH 曲线; D: 稳定 pH 曲线.
Note: A: The optimum temperature curve; B: The thermal stability curve; C: The optimum pH curve; D: The pH stability curve.

表 3 金属离子对果胶裂解酶活力的影响					
Table 3 Effect of metal ions to Pel activity					
金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)	金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)	金属离子 Metal ions	相对酶活力 Relative activity (%)
Stock	100	Ni ²⁺	101.9±1.7	Mn ²⁺	93.1±1.5
Zn ²⁺	120.0±2.1	NH ₄ ⁺	122.1±0.7	Mg ²⁺	92.8±1.2
Cu ²⁺	94.8±2.1	K ⁺	96.4±2.0	Pb ²⁺	16.8±0.6
Fe ³⁺	24.5±1.5	Ca ²⁺	130.7±1.3		

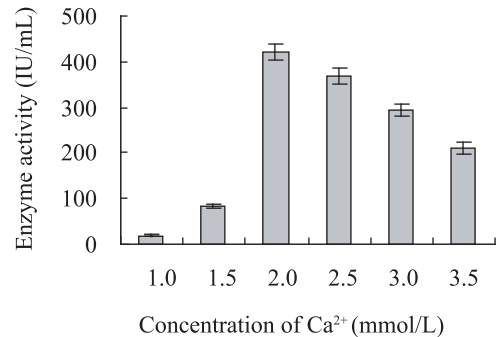


图 7 不同 Ca²⁺ 浓度条件下的果胶裂解酶活力
Fig. 7 Influence of Ca²⁺ concentration on Pel activity

果胶裂解酶对不同底物的 K_m 值和 V_m 值的测定结果(表 4)表明, 该酶对聚半乳糖醛酸钠的 K_m 值最小, V_m 值最大。与苹果果胶和橘子果胶相比, 该酶的最适底物为聚半乳糖醛酸钠。

3 结论与讨论

本研究从麻类脱胶高效菌株 *Dickeya* sp. DCE-01 克隆到一种碱性果胶裂解酶基因。其表达产物的最适 pH 为 9.0, 稳定 pH 为 9.0–10.0, 当

表 4 果胶裂解酶对不同底物的 K_m 和 V_m 值
Table 4 K_m and V_m values for Pel with different substrates

底物 Substrates	K_m (g/L)	V_m [$\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$]
聚半乳糖醛酸钠 Polygalacturonic sodium	5.99 \pm 0.12	13.94 \pm 0.23
苹果果胶 Apple pectin	6.93 \pm 0.09	12.77 \pm 0.14
橘子果胶 Orange pectin	6.25 \pm 0.19	9.17 \pm 0.27

pH 小于 8.0 时, 酶活力只能检测到 20%。经蛋白质结构分析, 该基因编码的蛋白属于 PF00544, 含有 Pectate lyase C 结构域。这一结果与应用于黄麻生物脱胶且来源于 *Streptomyces* sp. S27 的碱性果胶裂解酶结构域一致^[10]。

本研究发掘的碱性果胶裂解酶具有重要的工业应用前景。阳性克隆子发酵液中碱性果胶裂解酶活力达到 298.8 IU/mL (1 992.5 IU/mg), 与 *Paenibacillus campinasensis* BL11 (1 623 IU/mg)^[17]、*Bacillus subtilis* (142 IU/mL)^[18]、*Paenibacillus barcinonensis* (104 IU/mL)^[19]、*Bacillus pumilus* BK2 (76.8 IU/mL)^[20]等其他微生物来源的果胶裂解酶相比, 其酶活力具有明显优势。碱性果胶裂解酶是一种重要的清洁生产用酶, 主要运用于纸浆漂白和纺织品的生物精炼等行业, 酶解精炼方法可以从根本上解决传统工艺存在的环境和能源等问题, 在质量与环保方面具有传统工艺无法比拟的优点^[21]。

与同属模式菌株 *Dickeya dadantii* 3937 的 Pectate lyase B 比较, 本研究的果胶裂解酶除了最适反应温度^[22] (前者为 60 °C, 后者为 50 °C)、酶活力等少数指标存在差异之外, 其余酶学性质指标基本接近。经过基因序列及其表达产物的一级结构分析, 二者在蛋白质第 37、227、355、363、365、155、165、220 等 8 个位点上存在氨基酸种类不同的区别。至于是哪一个或几个位点的差异起决定性作用, 有待进一步研究。一旦明确其关

键位点, 有望通过点突变提高最适反应温度, 改变其酶学性质。

参 考 文 献

- [1] Gummadi SN, Kumar DS. Microbial pectic transesterases[J]. Biotechnology Letters, 2005, 27(7): 451-458.
- [2] Pissavin C, Robert-Baudouy J, Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Biochemical characterization of the pectate lyase PelZ of *Erwinia chrysanthemi* 3937[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1383(2): 188-196.
- [3] Reid I. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 26(2/4): 115-123.
- [4] Ouattara HG, Reverchon S, Niamke SL, et al. Molecular identification and pectate lyase production by *Bacillus* strains involved in cocoa fermentation[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 1-8.
- [5] Tanabe H, Yoshihara K, Tamura K, et al. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp.[J]. Journal of Fermentation Technology, 1987, 65(2): 243-246.
- [6] Xiao Z, Wang S, Bergeron H, et al. A flax-retting endopolygalacturonase-encoding gene from *Rhizopus oryzae*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 94(4): 563-571.
- [7] Basu S, Saha MN, Chattopadhyay D, et al. Large-scale degumming of ramie fibre using a newly isolated *Bacillus pumilus* DKS1 with high

- pectate lyase activity[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(2): 239–245.
- [8] Sharma S, Mandhan RP, Sharma J. *Pseudozyma* sp. SPJ: an economic and eco-friendly approach for degumming of flax fibers[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2697–2701.
- [9] Zheng L, Du Y, Zhang J. Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes[J]. Bioresource Technology, 2001, 78(1): 89–94.
- [10] Yuan P, Meng K, Shi P, et al. An alkaline-active and alkali-stable pectate lyase from *Streptomyces* sp. S27 with potential in textile industry[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012, 39(6): 909–915.
- [11] Basu S, Roy A, Ghosh A, et al. Arg235 is an essential catalytic residue of *Bacillus pumilus* DKS1 pectate lyase to degum ramie fibre[J]. Biodegradation, 2011, 22(1): 153–161.
- [12] Liu ZC, Duan SW, Sun QX, et al. A rapid process of ramie bio-degumming by *Pectobacterium* sp. CXJZU-120[J]. Textile Research Journal, 2012, 82(15): 1553–1559.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 27–32, 96–99, 1955.
- [14] Roy C, Kester H, Visser J, et al. Modes of action of five different endopectatelyases from *Erwinia chrysanthemi* 3937[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(12): 3705–3709.
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- [16] Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants[J]. Journal of the American Chemical Society, 1934, 56(3): 658–666.
- [17] Ko CH, Tsai CH, Tu J, et al. Expression and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* BL11 pectate lyase and its applications in bast fibre processing[J]. Annals of Applied Biology, 2011, 158(2): 218–225.
- [18] Soriano MP, Pastor FI. Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin[J]. Microbiology, 2006, 152(3): 617–625.
- [19] Soriano M, Blanco A, Diaz P, et al. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization[J]. Microbiology, 2000, 146(1): 89–95.
- [20] Klug-Santner BG, Schnitzhofer W, Vrsanská M, et al. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 121(3): 390–401.
- [21] 李平, 景庆庆, 邵蔚蓝. 海栖热袍杆菌来源的极耐热碱性果胶裂解酶的表达、纯化及定性[J]. 生物工程学报, 2009, 25(2): 223–229.
- [22] Tardy F, Nasser W, Robert-Baudouy J, et al. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(8): 2503–2511.