

## 生淀粉结合域 SBD 及糖化酶基因在毕赤酵母中的融合表达\*

### Fusion Expression of Raw Starch Binding Domain with Glucoamylase in *Pichia pastoris*

朱 婧, 刘海余, 王青艳, 米慧芝, 朱绮霞, 廖思明, 秦 艳, 申乃坤, 黄日波\*\*

ZHU Jing, LIU Haiyu, WANG Qingyan, MI Huizhi, Zhu Qixia, LIAO Siming, QIN Yan, SHEN Naikun, HUANG Ribo

(广西科学院 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西南宁 530007)

(National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】研究生淀粉结合域 SBD 及糖化酶基因在毕赤酵母中的融合表达, 提高酶的表达量和水解生淀粉的能力。【方法】利用 In-fusion<sup>TM</sup> PCR 克隆技术将淀粉结合域 SBD 无缝隙插入到黑曲霉糖化酶基因 *glu* 的 5' 端构建融合表达质粒 pPIC9K-*psg*, 实现融合酶基因 *psg* 在毕赤酵母 GS115 中的高效表达, 并进行酶学性质研究。【结果】融合酶的最适作用条件及热稳定性均与原始酶无明显差别, 但反应温度及 pH 值的范围更为宽泛, 在反应温度 60~70℃, pH 值为 4.0~7.0 时均较稳定; 融合酶 PSG 降解生淀粉的能力较原始酶 PG 提高 29.6%, 比原始菌株提高 86.5%。【结论】淀粉结合域 SBD 的融合提高了糖化酶水解生淀粉的能力。

**关键词:** 黑曲霉 ASP-S21 生淀粉糖化酶 淀粉结合域 In-fusion<sup>TM</sup> PCR Cloning 融合表达 毕赤酵母 GS115

中图分类号: TS231, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2016)01-0007-05

**Abstract:**【Objective】In order to improve the expression of glucoamylase from *Aspergillus niger* ASP-S21 and the hydrolysis ability of raw starch, the fusion expression of starch binding domain(SBD) with *glu* was conducted in *Pichia pastoris* GS115.【Methods】The fusion expression plasmid was constructed by inserting the SBD fragment to 5'-end of glucoamylase gene *glu* with In-fusion<sup>TM</sup> PCR Cloning technology. The recombinant enzyme(PSG) was over expressed in *Pichia pastoris* GS115 and its enzymatic properties were characterized.【Results】The PSG showed strong raw cassava starch hydrolyzing activity, which was 29.6% higher than the wild-type PG, and 86.5% higher than parental strain. The reaction temperature and pH of the ac-

fusion enzyme were more broad than that of the wildtype. It was stable in temperature range of 60~70℃ and pH range from 4.0 to 7.0.【Conclusion】The fusion of SBD with glucoamylase enables the fusion enzymes to hydrolyze raw starch more effectively.

**Key words:** *Aspergillus niger* ASP-S21, raw starch-digesting glucoamylase, starch-binding domain(SBD), In-fusion<sup>TM</sup> PCR Cloning, fusion expression, *Pichia pastoris* GS115

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20160315.018

收稿日期:2015-01-27

修回日期:2015-03-12

作者简介:朱 婧(1983-),女,助理研究员,主要从事发酵工程方面的研究。

\*国家自然科学基金项目(No. 31160023),广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 14123001-19),广西自然科学基金项目(No. 2013GXNSFBA019102),八桂学者建设工程专项经费和 2014 年留学人员科技活动项目资助。

\*\*通讯作者:黄日波(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事微生物生物技术以及酶工程研究, E-mail:rbhuang@163.com。

## 0 引言

【研究意义】淀粉能被多种淀粉酶水解,但这些酶中大约只有 10% 能结合并降解生淀粉<sup>[1]</sup>,其中生淀粉糖化酶(Raw starch-digesting glucoamylase, RSGA)是一种可以水解生淀粉的葡萄糖糖化生淀粉酶,可直接将未经蒸煮糊化的生淀粉降解成为葡萄糖,并可将淀粉发酵酒精中的糊化、液化、糖化三步变为一步,省去现代工业发酵生产酒精过程中的淀粉前期处理工艺,节约能源消耗,降低发酵生产酒精的成本。RSGA 通常具有一个明显的序列结构模块,即淀粉结合域 SBD(Starch-binding domains, SBD)<sup>[2]</sup>。真菌中的糖化酶所含有的 SBD 序列一般包括大约 100 个氨基酸残基,是一个由 7 个  $\beta$  链组成扭曲而且开放的  $\beta$  桶形结构<sup>[3-4]</sup>。文献<sup>[2, 5]</sup>证明, SBD 可以在整个蛋白结构中保持独立的功能,与糖化酶或淀粉酶融合后可显著增加不溶性淀粉在酶分子活性中心的浓度,赋予普通糖化酶或淀粉酶降解生淀粉的能力。【前人研究进展】现已发现在细菌、真菌的  $\alpha$ -淀粉酶、 $\beta$ -淀粉酶、细菌的环糊精转移酶以及真菌的糖化酶中都存在淀粉结合域<sup>[6]</sup>。本实验室杨键等<sup>[7]</sup>将 SBD 插入  $\alpha$ -淀粉酶(CN7A)基因的 5' 端融合表达,淀粉酶活力提高 8.7 倍,另有研究证明来源米根霉的糖化酶生淀粉酶活力显著,生淀粉利用率为 65%~70%,可以通过基因克隆和融合表达的方式,进一步提高生淀粉酶的活力。【本研究切入点】目前对该结合域融合表达的研究国内并未有报道。【拟解决的关键问题】笔者在前期的工作中筛选得到一株产酸性糖化酶的黑曲霉 ASP-S21,该酶在酸性条件下稳定性好且酶活力高,但降解生淀粉的酶活较低。经基因测序发现该基因未含有生淀粉结合域,因此将实验室原保藏的米根霉生淀粉结合域 SBD 片段与糖化酶基因在毕赤酵母中融合表达,提高其水解生淀粉能力和表达量,以期得到能在酸性环境下降解生淀粉的糖化酶。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

黑曲霉 ASP-S21 由本实验室筛选, pPIC9K 载体及毕赤酵母 GS115 来自 Invitrogen 公司。基因操作相关酶购自大连 TaKaRa 生物工程公司,反转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas, 酵母基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、小型质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒均购自上海华舜生物工程有限公司,其他

试剂为国产或进口的分析纯和生化试剂,实验所用到的 YPD、BMGY、BMMY 培养基均按 Invitrogen 公司酵母操作手册方法配制。

### 1.2 引物的设计及合成

根据已报道的黑曲霉糖化酶基因序列及淀粉结合域 SBD 基因序列,参照 In-fusion TM PCR Cloning Kit 的使用说明,将 SBD 片段及糖化酶基因片段通过引物的退火互补串联连接,再将串联片段接入载体 pPIC9K,为此,设计以下引物,下划线分别为引入的酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I:

psg1-1: 5' -AGCTTACGTAGAATTTCGCAAGTATTCCTAGCAGTGCTT-3',

psg1-2: 5' -GCGCTTGAAATCACTGTAGATACTTGGTAATTGGCA-3';

psg2-1: 5' -TACCAAGTATCTACAGTGATTTCCAAGCGCGACCTTG-3',

psg2-2: 5' -AATTAATTCGCGGCCGCCTAGAGATTCCGCCAGGTGT-3';

pg-1: 5' -ATAGAATTCGTGATTTCCAAGCGCGACCTTG-3',

pg-2: 5' -TAAGCGGCCGCCTAGAGATTCCGCCAGGTGT-3'。

引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 重组毕赤酵母表达质粒 pPIC9K - pg 及 pPIC9K-psg 的构建

利用液体筛选培养基培养黑曲霉,收集菌体,菌体用液氮研磨后,用 mRNA 抽提纯化试剂盒提取 mRNA。以黑曲霉 mRNA 做模板,根据反转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 的使用指南合成黑曲霉的双链 cDNA。以 pg-1/pg-2 为引物,以 cDNA 为模板 PCR 扩增,将 PCR 扩增得到的 *glu* 片段经纯化后,用 *EcoR* I、*Not* I 双酶切后,与同样双酶切的载体 pPIC9K 用 T4 连接酶连接,转化至 *E. coli* JM109,涂布在氨苄抗性的 LB 平板,抽提阳性转化子,用 *EcoR* I、*Not* I 酶切验证与测序,得到正确的表达载体命名为 pPIC9K-*pg*。

利用 In-Fusion 克隆技术得到的 SBD-*glu* 串联片段与载体 pPIC9K 按照上述方法构建表达载体 pPIC9K-*psg*。

### 1.4 酵母转化与高拷贝转化子筛选

利用 *Xba* I 酶切位点对重组质粒 pPIC9K-*pg* 与 pPIC9K-*psg* 进行线性化后,电转化毕赤酵母 GS115,电转化方法参见 Invitrogen 公司操作手册。利用 MD 和 MM 平板进行转化子筛选,在不同 G418

浓度(0.25 mg/mL、0.50 mg/mL、0.75 mg/mL、1.00 mg/mL、1.50 mg/mL、2.00 mg/mL)的 YPD 培养基平板进行高拷贝转化子筛选。

### 1.5 转化子的诱导表达及 SDS-PAGE 检测

挑取有高拷贝数的重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-*psg*、GS115/pPIC9K-*pg* 转化子,接种至 5 mL BMMY 液体培养基,过夜培养至  $OD_{600}$  达到 2.0~4.0,5 000 r/min 离心 5~10 min 收集菌体,再用 BMGY 液体培养基重悬细胞至  $OD_{600}$  为 1.0,进行诱导表达,每隔 24 h 补加甲醇以继续诱导,72 h 后收集酶液,测定酶活,同时 8 000 r/min 离心 10 min 取上清液,利用 SDS-PAGE 电泳分析表达产物<sup>[8]</sup>。

### 1.6 酶活力测定

将 0.4 mL 的 1%(W/V)可溶性淀粉与 0.3 mL pH 值为 4.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L)混合后置于 65℃ 保温 10 min,再加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,反应 10 min 后,立即加入 0.8 mL 的 3,5-二硝基水杨酸(DNS)终止反应并测定还原糖。在上述条件下反应后,每分钟产生 1  $\mu$ mol 还原糖(葡萄糖当量)所需要的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

### 1.7 酶的生淀粉降解性质分析

用 pH 值为 4.4 柠檬酸-磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L)配制成 1%(W/V)的木薯生淀粉悬液作为底物。首先在 50 mL 的锥形瓶中加入 4 mL 底物,50℃ 预热 10 min,再加入经过适当稀释的酶液 1 mL,50℃ 恒温振荡(180 r/min)反应 1 h 后,加入 0.5 mL、4%(W/V)NaOH 终止反应,最后取适当体积的反应液于 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液用 DNS 法测定还原糖量<sup>[9]</sup>。

### 1.8 生淀粉降解能力(RDA)计算

根据文献<sup>[9]</sup>的方法, $RDA = B/A \times 100\%$ ,其中  $B$  为降解生淀粉酶活, $A$  为降解糊化淀粉酶活。

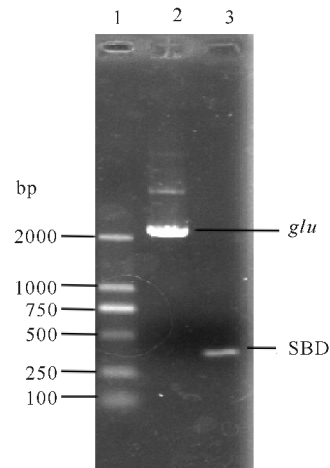
### 1.9 PSG 和 PG 最适条件及热稳定性分析

PSG 及 PG 酶液在 65℃ 下分别保温 1 min、3 min、5 min、10 min 和 15 min 取出后测定其残余酶活,绘制融合酶与原始酶的时间与残余酶活之间的关系曲线。在不同温度(40℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、90℃)下测定 pH 值为 4.4 条件下的酶活力,绘制温度与相对酶活之间的关系曲线。以不同 pH 值(2.2、3.0、4.0、4.4、5.0、5.4、6.0、6.4、7.0、8.0、9.0)缓冲液配制的可溶性淀粉溶液为底物,在 65℃ 分别测定融合酶与原始酶的酶活,得到 pH 值与相对酶活的关系曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pPIC9K-*pg* 与 pPIC9K-*psg* 的构建

利用所设计的 3 对引物 PCR 扩增得到黑曲霉糖化酶基因 *glu* 及淀粉结合域 SBD 基因片段(图 1),将图 1 中 2 号位的片段连接上 T 载体后测序,在 NCBI 上进行比对确定该片段为不含生淀粉结合域的黑曲霉糖化酶基因 *glu*。

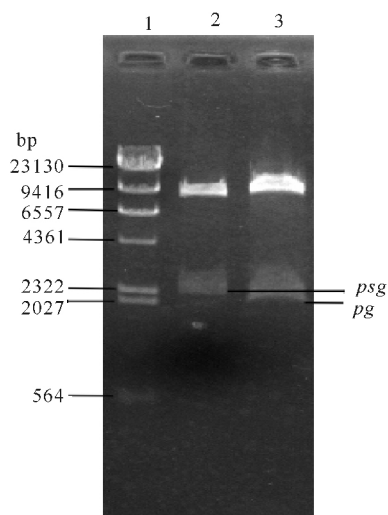


1: DL2000 DNA Marker; 2: PCR product of *glu*; 3: PCR product of SBD

图 1 *glu* 和 SBD PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of *glu* and SBD

由图 2 显示,构建的重组质粒 pPIC9K-*pg* 及 pPIC9K-*psg* 进行酶切鉴定、测序,确定糖化酶基因 *glu* 与淀粉结合域 SBD 均与表达载体 pPIC9K 的  $\alpha$  因子信号肽 3' 端融合,并且阅读框架正确无误。



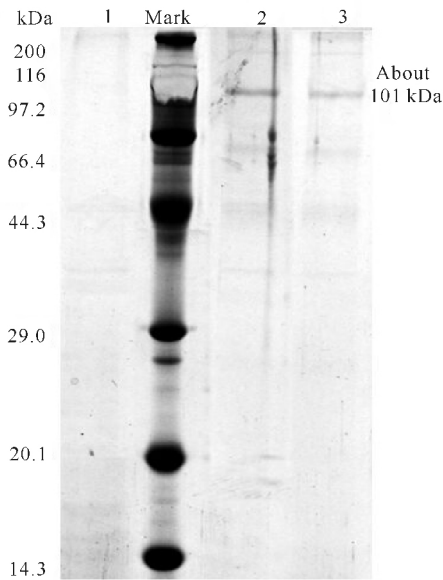
1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III; 2: pPIC9K-*psg*/*EcoR* I, *Not* I; 3: pPIC9K-*pg*/*EcoR* I, *Not* I

图 2 重组质粒 pPIC9K-*pg* 及 pPIC9K-*psg* 的酶切验证

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant plasmid pPIC9K-*pg* and pPIC9K-*psg*

## 2.2 重组质粒 pPIC9K-psg 与 pPIC9K-pg 的诱导表达

由图 3 可知,含 pPIC9K-psg 与 pPIC9K-pg 转化子的发酵液与不含质粒的原始菌比较均多出一条约为 101 kDa 大小的蛋白条带,表明目的蛋白得到了分泌表达。但 PG 及 PSG 表达蛋白所表现出的实际分子质量均大于理论值,因此推测这是毕赤酵母对目的蛋白进行糖基化修饰的结果。



Mark: 蛋白质分子质量标准; 1: 重组酵母 GS115/pPIC9K; 2: 重组酵母 GS115/pPIC9K-pg; 3: 重组酵母 GS115/pPIC9K-psg

Mark: molecular mass markers; 1: Recombinant yeast GS115/pPIC9K; 2: Recombinant yeast GS115/pPIC9K-pg; 3: Recombinant yeast GS115/pPIC9K-psg

图 3 PSG 及 PG 在毕赤酵母中表达的 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of PSG and PG expression in *P. pastoris*

## 2.3 融合酶 PSG 及原始酶 PG 的酶学性质比较

### 2.3.1 糖化酶活力以及水解生淀粉能力

由表 1 可知, PG 测得糖化酶活力为 7.72 U/mL, 生淀粉酶活力为 1.84 U/mL, RDA 值为 23.8%。转化子 PSG 糖化酶活力为 7.81 U/mL, 生淀粉酶活力为 2.64 U/mL, RDA 值为 33.8%。降解生淀粉的能力较未加 SBD 结合域的菌株提高 29.6%, 比原始菌株提高 86.5%。

### 2.3.2 最适作用条件及热稳定性分析

由图 4~6 可知, 融合酶的热稳定性并没有显著变化。最适作用温度, 最适作用 pH 值也与原始酶相同, 分别为 65°C 和 4.8, 但在高温条件(70~85°C)及偏酸性、碱性条件(pH 值为 4.0, 6.4~8.0)下融合酶的相对酶活均有所提高。

表 1 PSG 与 PG 的糖化酶活力以及水解生淀粉能力比较

Table 1 Comparison of glucoamylase activity and raw cassava starch hydrolyzing activity between the fusion enzyme and the wildtype

菌株编号 Strain number	糖化酶活力 Glucoamylase activity (U/mL)	生木薯粉酶活 Raw cassava starch hydrolysis activity (U/mL)	生淀粉降解能力 RDA (%)
ASP-S21	136.34±0.24	0.39±0.08	4.57±0.25
PG-3	7.72±0.35	1.84±0.05	23.80±0.80
PSG-2	7.81±0.21	2.64±0.14	33.80±1.43

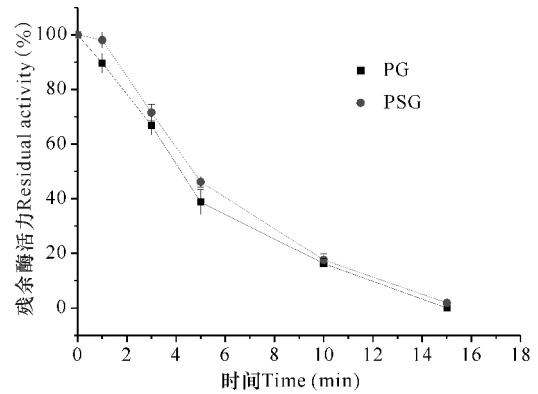


图 4 PG 及 PSG 在 65°C 下的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of PG and PSG at 65°C

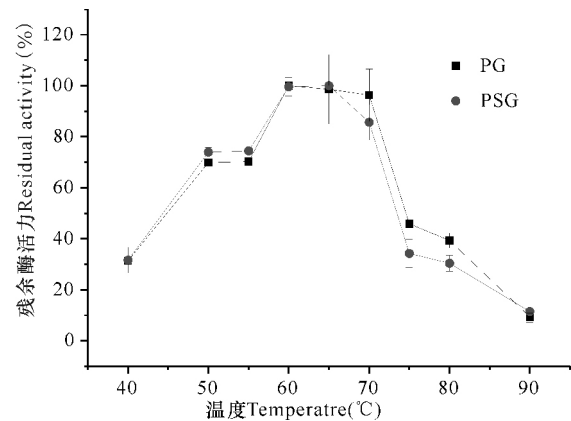


图 5 温度对 PG 及 PSG 酶活力的影响

Fig. 5 Temperature effects on PG and PSG activity

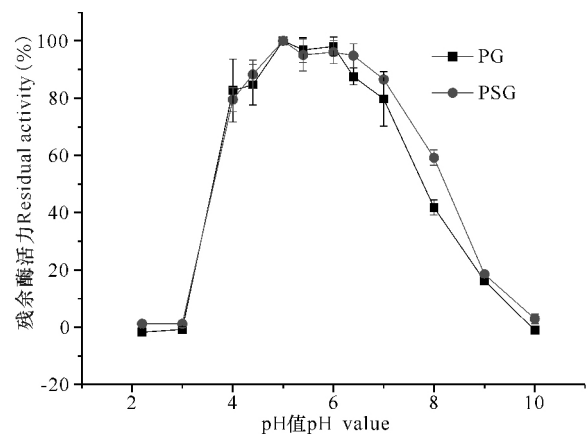


图 6 pH 值对 PG 及 PSG 酶活力的影响

Fig. 6 pH value effects on PG and PSG activity

### 3 结论

本研究将筛选得到的黑曲霉 ASP-S21 糖化酶基因与实验室原有的米曲霉 SBD 生淀粉结合域基因在毕赤酵母中融合表达,对融合酶与原始酶的酶学性质进行分析,可知:(1)测得原始酶转化子的 PG 糖化酶活力为 7.72 U/mL,生淀粉酶活力为 1.84 U/mL,RDA 值为 23.8%;融合转化子的 PSG 糖化酶活力为 7.81 U/mL,生淀粉酶活力为 2.64 U/mL,RDA 值为 33.8%。(2)PSG 降解生淀粉的能力比 PG 提高 29.6%,比原始菌株提高 86.5%,即融合酶较原始酶具有降解生淀粉的能力。(3)融合酶的最适反应温度、pH 值及热稳定性均与原始酶基本相同,但反应温度及 pH 值的范围均变得更为宽泛,融合酶在反应温度 60~70℃,pH 值为 4.0~7.0 时较为稳定。该融合酶对用生淀粉发酵生产酒精具有重要的推动作用。

#### 参考文献:

- [1] ROMINA R S,NORMA O,SERGIO S. Microbial starch-binding domain[J]. Current Opinion in Microbiology,2005,8:260-267.
- [2] 缪可嘉,王正祥. 淀粉酶系中淀粉结合域的结构和功能的研究进展[J]. 食品工业科技,2007(3):242-245.
- MIAO K J,WANG Z X. The structure and function of starch-binding domain(SBD) in starch combination with field research progress[J]. Science and Technology of Food Industry,2007(3):242-245.
- [3] LAWSON C L,VAN MONTFORT R,STROKOPYT-OV B,et al. Nucleotide sequence and X-ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 in a maltose-dependent crystal form [J]. J Mol Biol,1994,236(2):590-600.
- [4] SORIMACHI K,JACKS A J,LE GAL-COËFFET M F,et al. Solution structure of the granular starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. J Mol Biol,1996,259(5):970-987.
- [5] 季勤,JEAN-PAUL V,KRIT R,等. SBD 在重组蛋白质中位移对其酶活性及与淀粉粒结合性能的影响[J]. 南京师大学报:自然科学版,2005,28(1):88-92.
- JI Q,JEAN-PAUL V,KRIT R,et al. Effect of SBD's position in fusion proteins on activity and binding properties[J]. Journal of Nanjing Normal University:Natural Science,2005,28(1):88-92.
- [6] WANG Q H,WANG X Q,WANG X M. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation [J]. Process Biochemistry,2008,43(3):280-286.
- [7] 杨键,金辉,王青艳,等. 淀粉结合域与  $\alpha$ -淀粉酶的融合表达及其酶学性质[J]. 生物加工过程,2010,8(5):40-43.
- YANG J,JIN H,WANG Q Y,et al. Fusion expression of starch binding domain with  $\alpha$ -amylase and its properties[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering,2010,8(5):40-43.
- [8] 曾庆梅,魏春燕,靳靖,等. 黑曲霉酸性  $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品科学,2011,32(17):219-224.
- ZENG Q M,WEI C Y,JIN J,et al. Cloning of acid-stable of amylase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Food Science,2011,32(17):219-224.
- [9] 李凤玲,张璐,刘连成,等. 生淀粉糖化酶产生菌 *Cellulosimicrobium* sp. SDE 的分离鉴定及酶学性质的研究[J]. 工业微生物,2008,10(5):45-49.
- LI F L,ZHANG L,LIU L C,et al. Isolation of RSGA-producing strain *Cellulosimicrobium* sp. SDE and its enzymatic properties[J]. Industrial Microbiology,2008,10(5):45-49.

(责任编辑:竺利波)