

地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶产麦芽糖特性研究*

Studying on the Maltogenic α -amylase Property of the Production of Maltose from *Bacillus licheniformis*

刘金平^{1,2}, 于晶晶^{1,2}, 牛福星^{1,2}, 滕 昆^{1,2}, 覃晓丽^{1,2}, 韦宇拓^{1,2**}

LIU Jin-ping^{1,2}, YU Jing-jing^{1,2}, NIU Fu-xing^{1,2}, TENG Kun^{1,2}, QIN Xiao-li^{1,2}, WEI Yu-tuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. College of Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:为了开发新的生产麦芽糖浆的淀粉酶, 在大肠杆菌中表达了一个地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 麦芽糖 α -淀粉酶, 并对该酶产麦芽糖的特性进行研究。结果显示, 重组酶分子大小为 65 kDa, 以淀粉为底物的最适温度为 45℃, 最适 pH 值为 6.5。以浓度为 20% 的可溶性淀粉为底物, 加入 106U/g 淀粉的地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶, 反应 48h, 采用 HPLC 检测产物, 产物中只有葡萄糖和麦芽糖, 其中麦芽糖含量为 52.21%, 还原糖得率为 72.1%; 当加入 1U/g 淀粉的普鲁兰酶协同作用进行反应时, 产物中麦芽糖的含量增加到 57.16%, 还原糖得率增加到 92.5%。该酶在麦芽糖浆的工业生产上有较大的潜在应用价值。

关键词:地衣芽胞杆菌 麦芽糖 α -淀粉酶 麦芽糖 克隆表达

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2013)03-0171-05

Abstract: A maltogenic α -amylase from *Bacillus licheniformis* is cloned and expressed in *E. coli*. Enzymatic property and the production of maltose were studied for generating new amylase for maltose syrup. The recombinant enzyme molecular size was 65 kDa. The optimal activity for soluble starch hydrolysis was obtained at 60℃ and pH 6.6. The HPLC results showed that the hydrolysis products of 20% soluble starch by adding 106 U recombinant enzymes per gram starch for 48 hours were glucose and maltose and 52.21% of hydrolysates are maltose. The conversion rate was about 72.1%. Along with pullulanase (1U/g starch), the content of maltose reached 57.16% with 92.5% the conversion rate. The recombinant enzyme shows the great potential value in the production of maltose syrup industry.

Key words: *Bacillus licheniformis*, maltogenic α -amylase, maltose, cloning and expression

收稿日期: 2013-06-10

修回日期: 2013-06-18

作者简介: 刘金平(1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事基因工程的构建和酶工程研究。

* 广西科学研究与技术开发计划(No. 11107008-3), 广西研究生教育创新计划项目(YCSZ2012027)资助。

** 通讯作者: 韦宇拓(1971-), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事发酵与酶工程研究, Email: weiyutuo@gxu.edu.cn.

淀粉由多个葡萄糖分子通过 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键连接而成。由于其结构复杂, 通常需要一系列酶共同作用才能降解, 这些酶可以分为内切酶和外切酶。内切酶, 比如典型的 α -淀粉酶(EC 3.2.1.1), 可从淀粉、糖原和各种寡糖内部的 α -1,4-糖苷键催化分裂^[1,2] 得到。外切酶包括葡糖淀粉酶(EC 3.2.1.3), β -淀粉酶(EC 3.2.1.2) 和 α -葡糖苷酶(EC 3.2.1.20), 可以作用于淀粉的非还原端的 α -1,4-糖苷键生成葡萄糖或麦芽糖。能降解普鲁兰

糖和支链淀粉的 α -1,6-糖苷键的酶称为普鲁兰酶 (EC 3.2.1.41)^[3]。麦芽糖淀粉酶 (EC 3.2.1.133) 不同于典型的淀粉酶,他在不同底物中展现转糖苷和水解活性,能水解含有 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键的底物,能将水解生成的糖部分转化成另外的糖分子^[4],可以用来制备支链寡糖混合物和新的碳水化合物。

麦芽糖浆含有 40%~90% 麦芽糖,具有低吸湿性、低粘度、甜度低、抗结晶,能减少褐变能力,热稳定性好等特点,在食品工业中有很大的应用,例如:面包、糖果、啤酒等的生产。纯麦芽糖是麦芽糖的结晶,是从非常高浓度麦芽糖浆中获得的,在医药工业中用于生产疫苗、抗生素、麦芽糖醇等^[5]。工业上主要应用真菌 α -淀粉酶来生产麦芽糖浆,目前国际上仅有诺维信、丹尼斯克等少数几家大型酶制剂公司拥有真菌 α -淀粉酶的先进生产技术与产品。我国在用于生产麦芽糖浆的酶制剂方面的研究和开发还比较落后,应用酶制剂主要还是以传统的 α -淀粉酶为主,而对麦芽糖 α -淀粉酶的研究较少。生产麦芽糖新产品以及改良生产工艺已成为深入研究的热点。麦芽糖 α -淀粉酶具有多底物特性,他的一些酶学性质有其优越性,可单独或与普鲁兰酶一起用于高麦芽糖浆的生产,其主要产物为麦芽糖,在淀粉及食品工业中具有重要的工业应用价值。因此有必要对麦芽糖 α -淀粉酶进行一定的功能鉴定。研究和评价麦芽糖 α -淀粉酶产麦芽糖特性,有助于探索和开发其潜在的工业应用价值,有可能在淀粉糖化方面成为真菌 α -淀粉酶的一种补充或者替代。本文克隆地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶,在大肠杆菌中表达,并对其产麦芽糖特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PrimerSTAR HS DNA 聚合酶,限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III, T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司。金属镍亲和层析介质购自 pharmacia 公司。麦芽糖、麦芽三糖为色谱纯,其他试剂均为分析纯。高温 α -淀粉酶、普鲁兰酶购自丹麦 NOVO 公司。

1.2 菌株及质粒

地衣芽胞杆菌 ATCC14580 购自中国微生物菌种保藏中心。表达载体 pET22b(+),大肠杆菌 BL21(DE3)由本实验室保存。

1.3 引物的设计

根据 GenBank 中一个来源于地衣芽胞杆菌,注

释为 α -淀粉酶 (α -amylase) 的 ORF (GI: 52002305) 的 DNA 序列设计引物 (P1、P2),扩增其 DNA 序列,命名为 BL。

P1:CGC CATATGCATCACCATCACCATC - ACATGGAATATGCAGCGAT,下划线为 *Nde* I 酶切位点,斜体的为六组氨酸标签;

P2:CCC AAGCTTTTAGACCGCCCCCAA - A,下划线为 *Hind* III 酶切位点。

1.4 BL 基因的扩增

利用机械破胞法提取地衣芽胞杆菌基因组 DNA,以其为模板,以 P1、P2 为引物,扩增 BL。反应体系为 50 μ l,扩增条件:98 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2.5 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 BL 表达载体的构建及目的蛋白的表达及纯化

将纯化的 BL 用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行双酶切连接到同样双酶切的表达载体 pET22b(+)上,得到重组表达质粒 pET22b-BL。把重组表达质粒 pET22b-BL 转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中进行表达。将阳性转化子在 37 $^{\circ}$ C 摇床中培养,当 OD₆₀₀ nm 达到 0.8 左右时,加入终浓度达到 1 mmol/L 的 IPTG,在 20 $^{\circ}$ C 继续培养 18 h。离心收集菌体,用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 值 7.0) 重悬,然后在冰浴条件下超声波破胞。收集上清,使用金属镍亲和层析法进行纯化,再利用 SDS-PAGE 凝胶电泳来检测纯化效果。

1.6 酶活及还原糖含量的测定

淀粉酶活力测定参照 Bernfeld 法^[6]。在最适温度及最适 pH 条件下,按上述反应,每分钟生成 1 μ mol 还原糖所需的酶量为一个酶活单位 (1U)。

用碘量法^[7]测定还原糖的含量。

1.7 淀粉反应

用 pH 值 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制浓度为 20% 的可溶性淀粉,按照 106U/g 淀粉的比例加入重组酶,于 45 $^{\circ}$ C 温水浴中反应 48h。煮沸灭酶活,离心后用高效液相色谱法检测产物。

1.8 普鲁兰酶协同作用

取适量 20% 的淀粉溶液,按照 106U/g 淀粉加入重组酶,1U/g 淀粉加入普鲁兰酶,于 45 $^{\circ}$ C 温水浴中反应 48h。煮沸灭酶活,离心后高效液相色谱法检测产物。

1.9 重组酶水解产物的分析

用 HPLC 分析重组酶水解产物,工作条件如

下,仪器:Agilent 1100 Series 色谱仪;色谱柱:Alltima Amino 10 柱(4.6 mm \times 250 mm);检测器:Alltech 2000ES 型蒸发光散射检测器;流动相:78%乙腈,22% H₂O;流速:1 ml/min;进样量 20 μ l;柱温:28 $^{\circ}$ C。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆、表达及纯化

PCR 扩增出约 1.7Kb 的片段,将其酶切与同样酶切的表达载体 pET22b(+)连接。重组质粒转化进大肠杆菌 BL21 中,诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳得一条相对分子质量约 65kDa 的目的条带(图 1 的泳道 2),经镍柱纯化得到目的重组蛋白(图 1 的泳道 3),表明该 ORF 成功获得表达,经镍柱纯化获得单一目的条带,可以进行酶学性质分析。

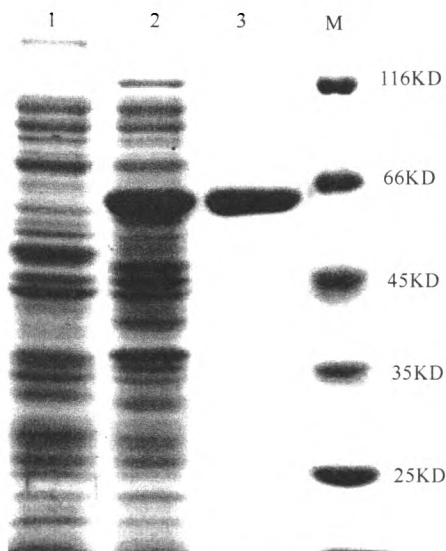


图 1 纯化后的重组麦芽糖淀粉酶 BL 的 SDS-PAGE 分析

泳道 1:诱导空载体 pET22b(+)/BL21 可溶性蛋白;泳道 2:诱导转化子 pET22b-BL/BL21 可溶性蛋白;泳道 3:纯化的 BL 蛋白;泳道 M:蛋白 Marker。

2.2 重组酶的酶学性质

2.2.1 重组酶的最适温度

分别在 30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 测定相对酶活力。将 pH 值 6.5 的 2% 淀粉分别置于上述不同温度的恒温水浴锅中保温 5min,然后加入适量稀释的纯酶液,反应 10min 后加入 DNS,沸水浴 5min,然后测 OD₅₂₀。以最高的酶活力为 100%,其他温度用相对酶活力表示,并绘制温度-相对酶活力曲线。由图 2 可知,该酶的最适温度为 45 $^{\circ}$ C,在 35~50 $^{\circ}$ C 较稳定。

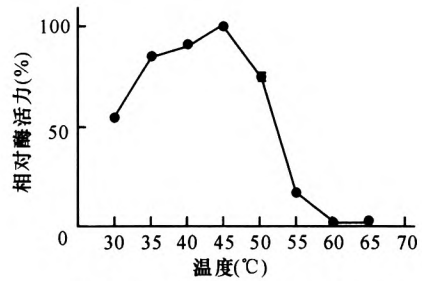


图 2 温度对重组酶活力影响

2.2.2 重组酶的最适 pH 值

在 45 $^{\circ}$ C 下,用 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制 2% 的淀粉测定相对酶活力。将不同 pH 值的 2% 淀粉置于 45 $^{\circ}$ C 下保温 5min,然后加入适量的稀释的纯酶液,反应 10min 后加入 DNS,沸水浴 5min,然后测 OD₅₂₀。以最高酶活力为 100%,其他 pH 值用相对酶活力表示,并绘制 pH-相对酶活力曲线。由图 3 可知,该酶的最适 pH 值为 6.5,在 pH 值 6.0~7.0 较稳定。

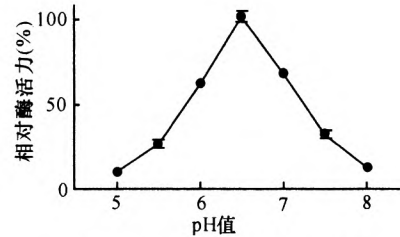


图 3 pH 对重组酶活力影响

2.3 重组酶水解淀粉产物分析

图 4~6 为标样色谱,样品处理后经 HPLC 检测结果如图 7,8 所示。

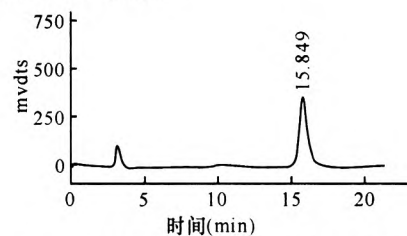


图 4 葡萄糖标样 HPLC 分析色谱

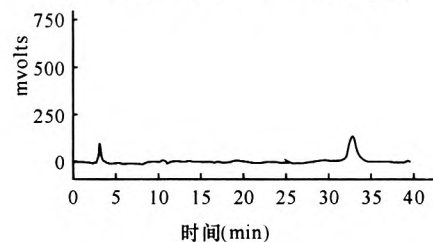


图 5 麦芽糖标样 HPLC 分析色谱

从图 7 和图 8 可以看出,地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶作用于淀粉只生成葡萄糖和麦芽糖两种产物。再根据图 7、图 8 中峰面积计算各产物的含量得表 1。由表 1 可知麦芽糖含量为 52.21%,还原糖

得率为 72.1%。

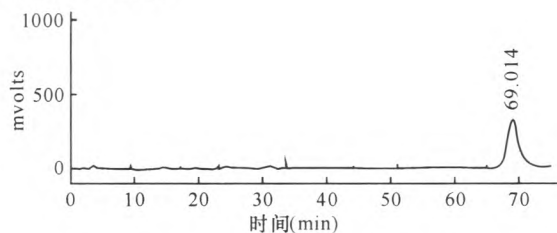


图6 麦芽三糖标样 HPLC 分析色谱

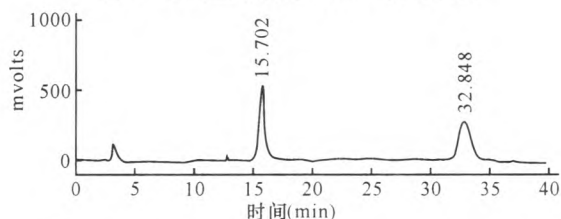


图7 重组酶水解淀粉产物 HPLC 分析色谱

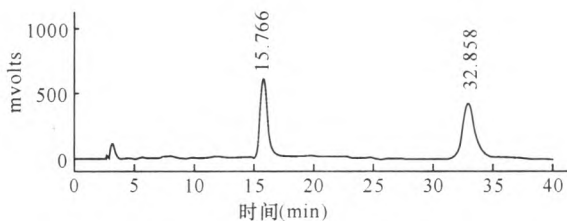


图8 重组酶与普鲁兰酶协同作用水解淀粉产物 HPLC 分析色谱

表1 重组酶水解淀粉产物含量分析

反应酶	产物		还原糖得率
	葡萄糖	麦芽糖	
麦芽糖 α -淀粉酶	47.79%	52.21%	72.1%
麦芽糖 α -淀粉酶+普鲁兰酶	42.84%	57.16%	92.5%

加入 106U/g 淀粉的高温 α -淀粉酶反应 48h, 同样处理后经 HPLC 检测, 结果如图 9 所示。

由图 9 可知, 高温 α -淀粉酶水解淀粉生成 3 种产物, 其中葡萄糖含量为 57.53%, 麦芽糖含量为 24.52%, 麦芽三糖含量为 17.95%, 还原糖得率为 53.2%。

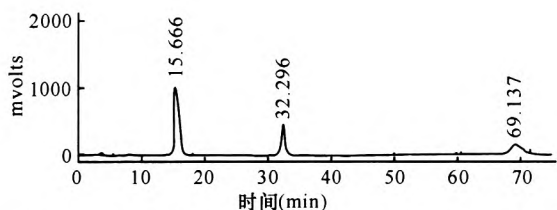


图9 高温 α -淀粉酶水解淀粉产物 HPLC 分析色谱

3 结论

本文克隆表达的地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶产麦芽糖的最适 pH 值为 6.5, 最适温度为 45℃, 与訾楠等^[8]报道的麦芽糖 α -淀粉酶粗酶学性质相符。地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶作用浓度为 20% 的可溶性淀粉, 只有葡萄糖和麦芽糖两种产物, 产物中麦芽糖含量为 52.21%, 还原糖得率为 72.1%; 加入普鲁兰酶后产物中麦芽糖含量为 57.16%, 还原糖得率达到 92.5%; 而高温 α -淀粉酶在同样的反应体系里反应同样的时间, 有葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖 3 种产物, 麦芽糖的含量仅为 24.52%, 还原糖得率为 53.2%。这是由于麦芽糖 α -淀粉酶能水解 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键, 比一般 α -淀粉酶利用淀粉生成还原糖的程度高且生成麦芽糖含量较高, 今后可以尝试把麦芽糖 α -淀粉酶作为麦芽糖浆生产中的糖化酶。

目前工业上常用真菌 α -淀粉酶作为糖化酶生产麦芽糖浆, 其最适 pH 值约为 5.5, 反应温度为 60℃ 左右, 产品中麦芽糖含量在 50%~60%^[9]。液化用的高温 α -淀粉酶最适 pH 值为 6.5 左右^[10], 如果糖化酶的最适反应 pH 值也为 6.5, 则可省略调节 pH, 而地衣芽胞杆菌麦芽糖 α -淀粉酶生产麦芽糖浆的最适反应 pH 值为 6.5, 最适反应温度为 45℃, 维持其反应比维持高温反应能耗低, 从而可以降低成本。说明该酶在生产高麦芽糖浆、麦芽糖或者高转化率糖浆等领域具有一定的工业前景。

参考文献:

- [1] Van der Maarel M J, Van der Veen B, Uitdehag J C, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family[J]. J Biotechnol, 2002, 94:137-155.
- [2] Gupta R, Paresh G, Harapriya M, et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective [J]. Process Biochem, 2003, 38(11):1599-1616.
- [3] Nair S U, Singhal R S, Kamat M Y. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA 213 [J]. Biores Technol, 2007, 98(4):856-859.
- [4] Kim D Y, Cha C H, Oh W S, et al. Expression of the promoter for the maltogenic amylase gene in *Bacillus subtilis* 168[J]. J Microbiol, 2004, 42:319-327.
- [5] Okada M, Nakakuki T. Oligosaccharides: production, properties and applications[M]//Schneck F W, Hebeda R E(Eds.). Starch hydrolysis products. Worldwide Technology, Production and Applications. New York:

VCH Publishers;335-366.

- [6] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000,42-46.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009. 7-2003 食品中还原糖的测定[S]. 2003.
- [8] 瞿楠,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.
- [9] 施金堂,刘汉文. 利用真菌淀粉酶生产高麦芽糖浆工艺研究[J]. 食品科学,1996,17(6):53-54.
- [10] 徐忠,张洪微,韩玉洁. 酶法制备马铃薯高麦芽糖浆的研究[J]. 中国食品学报,2005,5(1):37-42.

(责任编辑:尹 闯)

(上接第 170 页)

- [4] 范陆薇,吕良鉴,王颖,等. 宝石级红珊瑚的激光拉曼光谱特征[J]. 宝石和宝石学杂志,2007,9(3):1-3.
- [5] 高岩,张辉. 天然及染色红珊瑚的拉曼光谱研究[J]. 宝石和宝石学杂志,2002,4(4):20-24.
- [6] 李秀保,黄晖,张俊彬,等. 通过核糖体 18S rDNA 探讨柳珊瑚分子系统发育关系[J]. 海洋通报,2006,25(6):10-19.
- [7] Coll J C. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia)[J]. Chem Rev,1992,92:613-621.
- [8] Rodríguez A D. The natural products chemistry of West Indian gorgonian octocorals [J]. Tetrahedron, 1995,51:4571-4618.
- [9] Sung P J, Gwo H H, Fan T Y, et al. Natural product chemistry of gorgonian corals of the genus *Junceella* [J]. Biochem Syst and Ecol,2004,32:185-196.
- [10] 赵美霞,余克服,张乔民. 珊瑚礁区的生物多样性及其生态功能[J]. 生态学报,2006,26(1):186-199.
- [11] Tao Z H, Wang G W, Xu X D, et al. Monitoring and rapid quantification of total carotenoids in *Rhodotorula glutinis* cells using laser tweezers Raman spectroscopy[J]. FEMS Microbiol Lett,2011,314(1):42-48.
- [12] Bergamonti L, Bersani D, Csermely D, et al. The nature of the pigments in corals and pearls; A contribution from Raman spectroscopy[J]. Spectroscopy Letters,2011,44(7~8):453-458.
- [13] Urmos J, Sharma S K, Mackenzie F T. Characterization of some biogenic carbonates with Raman spectroscopy[J]. Am Mineral,1991,76:641-646.

(责任编辑:陈小玲)