

网络优先数字出版时间: 2016-05-17

网络优先数字出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1075.N.20160517.1545.006.html>

新型 I 型普鲁兰酶基因的克隆表达及酶学性质 * Cloning, Expression and Enzymatic Characterization of a New Type I Pullulanase Gene

王青艳, 申乃坤, 朱 婧, 秦 艳, 朱绮霞, 谢能中, 李 亿, 黄日波 **

WANG Qingyan, SHEN Naikun, ZHU Jing, QIN Yan, ZHU Qixia, XIE Nengzhong, LI Yi, HUANG Ribo

(广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】筛选并克隆表达高酶活且具有一定热稳定性的新型普鲁兰酶。【方法】克隆 *Tumebacillus flagellatus* GST4 的普鲁兰酶基因 *pulB*, 构建重组质粒后转化宿主菌大肠杆菌进行诱导表达, 再运用亲和层析进行纯化并分析其酶学性质和结构。【结果】*pulB* 在大肠杆菌中实现可溶性表达, 发酵液上清酶活力达到 78 U/mL, 粗酶液经纯化后比活力为 258 U/mg。重组酶 PulB 最适反应温度和 pH 值分别为 55°C 和 5.0, 在较窄的酸性范围内 (pH 值 4.5~5.5) 酶活力比较稳定; 对普鲁兰糖的 $K_m = (16.28 \pm 0.03) \text{ mg/mL}$, $V_{\max} = (22.05 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。PulB 的 DNA 序列与 GenBank 数据库里的任何序列都没有同源性, 在蛋白质序列上, 由基因 *pulB* 编码的氨基酸序列与 *T. aegyptius* 的环麦芽糖糊精酶相似性最高, BlastX 比对的 Identities 为 54%, Positives 为 69%。SMART 结构预测分析发现, *pulB* 具有淀粉酶的结构域。底物特异性分析表明, 它可水解普鲁兰糖和支链淀粉生成线性的低聚糖或麦芽三糖。【结论】重组酶 PulB 是尚未报道的新型普鲁兰酶, 它可水解普鲁兰糖和支链淀粉, 属 I 型普鲁兰酶。

关键词: I 型普鲁兰酶 膨胀芽孢杆菌 克隆表达 酶学性质

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2016)02-0136-10

Abstract:【Objective】Screening, cloning, heterologous expression of the pullulanase encoding gene from *Tumebacillus flagellatus* GST4 in order to obtain efficient expression of a new pullulanase and enhance its activity and thermostability.【Methods】Cloning, construction of

收稿日期: 2016-03-23

作者简介: 王青艳(1972-), 女, 博士, 主要从事微生物酶与菌种选育研究。

* 国家自然科学基金项目(31160023, 31400079), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 14123001-19, 桂科合 15104001-1), 广西自然科学基金项目(2015GXNSFB139044), 广西“八桂学者”、南宁市特聘专家和留学人员科技活动项目择优资助项目和广西科学院基本科研业务费项目(15YJ22SW01)资助。

** 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程研究, E-mail: rbhuang@gxas.cn。

recombinant and heterologous expression of pullulanase gene in *Escherichia coli*, purification by Ni-chelating affinity chromatography from cell free culture supernatant and characterization of pullulanase were carried out.【Results】The pullulanase gene *pulB* was cloned and expressed successfully in *E. coli*, and the activity of cultural supernatant can reach 78 U/mL. And PulB was purified to homogeneity and the specific activity was 258 U/mg. The optimal temperature

of purified PulB is 50°C, its optimal pH value is 5.0 and activity remains stable within the acidic range of pH 4.5~5.5. PulB displayed typical Michaelis-Menten kinetics, where its K_m is (16.28±0.03) mg/mL and V_{max} is (22.05±0.02) $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively, when used pullulan as substrate. GenBank blast results show that there is no homologous DNA sequences with *pulB*, and the encoding protein of PulB had the highest identity (54%) with cyclomaltodextrinase from *Thermicanus aegyptius*. We find that it has amylase structure domain by online SMART searching. The substrate specificity analysis shows that it typically hydrolyze pullulan and amylopectin to produce linear oligosaccharides or maltotriose. **【Conclusion】**PulB is a new starch/pullulan hydrolase, which has not yet been reported. It can hydrolyze pullulan or amylopectin and belong to type I pullulanase.

Key words: type I pullulanase, *Tumebacillus flagellatus*, cloning and expression, enzymatic characterization

0 引言

【研究意义】普鲁兰酶(Pullulanase, EC 3.2.1.41)是 α -淀粉酶家族GH13中的一种脱支酶,它能够专一性的水解普鲁兰、淀粉和糖原中的 α -1,6-糖苷键^[1]。自然界中的淀粉大多为支链淀粉^[2],其中 α -1,6-糖苷键占4%~5%。普鲁兰酶能分解支链的特性决定了它在淀粉加工业中的广泛应用,比如:在淀粉水解过程中专一性切开支链淀粉分支点中的 α -1,6-糖苷键,从而剪下整个侧枝形成直链淀粉,后者具有很好的抗水性和成膜性,有望用于生产可食性包装膜,解决“白色污染”问题;I型普鲁兰酶能够与 α -淀粉酶、 β -淀粉酶等协同作用生产高葡萄糖浆、超高麦芽糖浆、提高啤酒中的发酵度;普鲁兰酶和 α -淀粉酶以及糖化酶协同作用,可在以非粮木薯为原料生产酒精的液化和糖化过程发挥作用,普鲁兰酶要求的底物分子结构最小,它可以将最小单位的支链分解,最大限度地利用淀粉原料,加速糖化过程,从而有效的提高淀粉利用率和水解效率^[3]。除此之外,采用普鲁兰酶将各类淀粉脱支后再糊化老化处理可增加抗消化淀粉的含量,后者对人体血糖水平、肥胖、癌症、脂质代谢和能量等方面有重要生理功能^[4]。而目前工业应用上的挑战是能否找到满足低成本高产、且酶学性质(如耐酸、耐热)符合工业应用要求的普鲁兰酶。因此,通过筛选高产菌株、克隆异源表达以及突变普鲁兰酶基因等方式,获得所需的普鲁兰酶,具有重要的应用研究意义。**【前人研究进展】**普鲁兰酶最初是由Bender和Walleneffs于1966年通过产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)发酵获得^[5]。此后,各国的科研人员经过广泛深入研究,从不同的地区微生物中获得该酶。1975年日本

的Yoshiyuki Takaskai^[6]发现蜡状芽孢杆菌罩状变种(*Bacillus cereus* Var. mycodes)能产普鲁兰酶,该酶的最佳作用条件为pH值6.0~6.5,温度50°C。20世纪80年代初,丹麦Novo公司以嗜酸性分解普鲁兰多糖芽孢杆菌(*Bacillus acidipullulyticus*)^[7]研发出耐热(60°C)耐酸(pH值4.5)的商品普鲁兰酶Pormozyme,是目前应用最广且产量最大的普鲁兰酶。20世纪90年代,Deweer等^[8]发现普鲁兰酶产生菌*Bacillus naganensis*;Tomimura等^[9]筛选出*Bacillus deramificans*,这两株菌与*B. acidipullulyticus*所产普鲁兰酶的酶学性质相似,其发现进一步拓宽了普鲁兰酶的应用。随着基因工程技术的发展,利用其构建基因工程菌,以提高目的蛋白的产量并减少下游工艺的成本,这在世界范围内越来越广泛地得到重视并加以应用。1984年,日本科学家在大肠杆菌中成功表达*Klebsiella aerogenes*普鲁兰酶基因,但酶活力水平不高且在非选择性培养基中表现型极不稳定。1985年,Takiazwa把普鲁兰酶基因(包括结构基因和操纵基因)克隆入多拷贝载体pBR322,得到比野生菌株酶活力水平高20~40倍的工程菌,此工程菌能保持高酶活力水平两周。上述这些酶大部分都是不能分泌到胞外的胞内酶。1999年,Tomimura从*Bacillus naganensis*(ATCC53909)中分离出普鲁兰酶基因,并在原核生物表达系统枯草芽孢杆菌中成功表达,所产生的重组普鲁兰酶具有很好的应用特性^[10]。该酶在60°C时测得最适反应pH值为5.0,在pH值为4.5条件下测得最适反应温度为60°C;在pH值4.5,60°C保温55h仍有50%的残余酶活力,具有较好的热稳定性。此后,特别是进入20世纪90年代后,相继有许多耐热普鲁

兰酶基因被克隆、测序并在大肠杆菌和枯草杆菌中表达,有的还申请专利保护^[10-11]。目前已有数十个普鲁兰酶基因在以大肠杆菌为主的表达系统中实现异源表达。通过基因工程手段表达并提高普鲁兰酶产量是普鲁兰酶基础研究和应用研究的主要发展方向。另外,淀粉加工时通常采取 55~60℃ 的反应温度,这就对普鲁兰酶在该温度下的物理化学稳定性提出较高的要求。【本研究切入点】虽然基因工程技术使得普鲁兰酶的异源表达研究取得了一些成绩,但总体来说表达水平不高。我国从 20 世纪 70 年代开始便研究开发普鲁兰酶,但是到目前仍然仅限于实验室研究并且酶活力较低^[12-13],一般为 2~5 U/mL,这些酶的产生菌株大多为病原菌,其发酵液不能直接用于工业添加,特别是食品工业,因此普鲁兰酶基因的重组表达至关重要。【拟解决的关键问题】本研究采用 Novagen 公司的 pET 表达系统异源表达 *T. flagellates* GST4 普鲁兰酶基因,并进行酶学性质和结构预测分析。通过异源可溶性表达提高酶的产量,获得新的 I 型普鲁兰酶并初步探讨其结构与功能的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

菌株 *T. flagellates* GST4 为本实验室从位于南宁的木薯淀粉废水中筛选所得^[14],大肠杆菌 *E. coli* DH5 α (本实验室保存)用于常规的克隆和质粒繁殖宿主,大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)(Stratagene)为表达宿主。pET-22b(+)(Novagen)是具有氨苄抗性、N 端信号肽 *pelB* 和 C 端 6-His 标签的表达载体,pMD-18T(TaKaRa)为 T-载体。

1.2 试剂

Prime START 聚合酶、rTaq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、dNTPs、T4 DNA 连接酶、小牛肠性磷酸酶(CIP)、DNA 连接试剂盒、DNA Maker DL2000、 λ /*Hind*III DNA Marker 和蛋白质分子量标记均购自 TaKaRa 公司,蛋白酶 K、RNA 酶 A 和 DMSO 购自 Fermentas 公司,细菌基因组 DNA 提取试剂盒、质粒小量提试剂盒和凝胶回收试剂购自北京天根公司,镍填充料 Chelating Sepharose 购自 Amersham Biosciences 公司,Sephadex G200 购自 Pharmacia 公司,Bradford 蛋白质检测试剂盒购自 Genaray,蛋白质电泳预制胶购自 Bio-rad,咪唑购自上海生工生物工程有限公司,普鲁兰糖、可溶性淀粉和支链淀粉等购自国药集团化学试剂有限公司,引

物合成和测序均由上海生物工程公司完成。

1.3 培养条件

挑取单菌落于 LB 液体培养基中,37℃,220 r/min 摇床振荡培养过夜活化,用接种环在固体平板划线,固体平板倒置于 37℃ 恒温箱培养过夜。挑取单菌落于新鲜的 LB 液体培养基中摇床培养约 12 h 后,按 1%(V/V)的接种量接种于新鲜的 LB 液体培养基中,37℃,220 r/min 培养约 3~4 h 后,加入 IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L,继续培养 12~16 h,收集菌液。

1.4 总 DNA 和质粒的提取

新鲜平板上挑取单菌落接入液体培养基,过夜培养,收集菌体细胞用于总 DNA 和质粒 DNA 提取,提取方法参照文献[15]。

1.5 表达载体的构建

1.5.1 *pulB* 的克隆和基因序列分析

根据已经测序 *T. flagellatus* GST4 基因组的注释为假设普鲁兰酶的基因序列设计引物,所用的上下游引物(下划线分别为引入的酶切位点 *Bam*H I 和 *Hind*III)序列为

pulB-F:5'-CGC GGATCCCAATCAGGAAG-CTATTTTCA-3';

pulB-R:5'-ACC AAGCTTCACCGTTCCGC-CGCTCA-3'。

以 *T. flagellatus* GST4 的总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 50 μ L 反应液中含有 5 \times PS PCR 缓冲液 10 μ L,dNTPs 200 μ mol/L,总 DNA 模板 10 ng,引物各 3.2 pmol,PrimeSTAR DNA 聚合酶 5 U。扩增程序为 95℃ 预变性 2 min;98℃ 10 s,53.6℃ 15 s,72℃ 2 min,共 30 个循环延伸;72℃,10 min。

扩增成功后用 OMEGA 公司 Extraction Kit 纯化普鲁兰酶基因,*pulB* 回收的片段一部分经 TA 克隆之后与 T 载体 pMD18-T 连接,获得 pMD-*pulB* 用于测序;另一部分作下一步的双酶切。

基因 *pulB* 的序列用 megablast (highly similar sequences) 软件检索 GenBank 核苷酸数据库^[16];用 BlastX 软件检索 GenBank 氨基酸数据库;用在线 SMART(Simple Modular Architecture Research Tool,http://smart.embl.heidelberg.de)工具分析预测该基因编码蛋白质序列的组件结构和功能域^[17]。

1.5.2 *pulB* 与载体的酶切、连接和转化

DNA 片段与载体的酶切、连接和转化参照文献

[15],将 PCR 扩增得到的 *pulB* 目的片段用 *Bam* H I / *Hind* III 双酶切,与经同样双酶切的质粒载体 pET-22b(+)的大片段混合,用连接酶于 16℃ 连接过夜,连接产物转化宿主大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,冰上放置 30 min,42℃ 水浴热击 90 s,加入 600 μ L 经 42℃ 预热的 SOC 培养基,于 37℃,200 r/min 预培养 30 min,取适量涂布于含氨苄抗性的 LB 平板,37℃ 恒温箱倒置培养过夜。转化子提取质粒后用 *Bam* H I / *Hind* III 进行双酶切验证,同时以转化子质粒为模板,用原扩增引物进行 PCR 验证。

1.6 重组质粒 pET-*pulB* 的诱导表达和纯化

1.6.1 诱导表达

将重组质粒 pET-*pulB* 转化表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,挑取转化子用含合适氨苄的 LB 液体培养基过夜培养 12 h,按 1%(V/V)的接种量转接到 50 mL 的 LB(含 100 μ g/mL 氨苄)培养基中,37℃,220 r/min 摇床振荡培养至 OD_{600} 为 0.4~0.6 时加入 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L),在 25℃,220 r/min 继续培养 14 h,离心收集上清,上清装入透析袋,外敷 PEG6000 置于 4℃ 冰箱中进行透析浓缩,至透析袋中的液体量剩余约为 10 mL 时转入干净的 50 mL 离心管,4℃,8 500 r/min 离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。

1.6.2 重组酶的纯化

通过重组酶 C 端的 6-His 标签与镍离子的螯合进行纯化^[18],纯化过程尽量在较低温(4~10℃)下进行。金属螯合物的亲和层析-镍(IMAC)柱含 5 mL 柱床体积的螯合琼脂糖凝胶(FF)介质,介质经 NiCl₂ 装载平衡后用超纯水洗涤,用 25 mL 平衡缓冲液(300 mmol/L NaCl,5~10 mmol/L 咪唑,50 mmol/L pH 值为 7.4 磷酸缓冲液)平衡柱子,粗酶液调节至与平衡缓冲液相同的 pH 值后上柱,再依次用 25 mL 咪唑浓度分别为 20 mmol/L 和 60 mmol/L 的平衡缓冲液洗涤杂蛋白,目的蛋白用 25 mL 咪唑浓度为 250 mmol/L 的平衡缓冲液洗脱,收集含目的蛋白质的洗脱液,用截留分子量为 30 000 Da 的 Millipore 超滤离心管进行缓冲液置换,所得的纯酶溶解在 pH 值为 5.0 的 50~100 mmol/L 磷酸钠-柠檬酸缓冲液中,并加入终浓度为 10%(V/V)的甘油做保护剂,用于进行 SDS-PAGE 分析、酶活力测定和酶学性质分析。

1.7 蛋白质含量检测

蛋白质含量测定参照 Bradford 法^[19]进行,采用 BRADFORD 蛋白浓度测定试剂盒测定样品蛋白浓

度,以牛血清蛋白(BSA)为蛋白质标准,测定 OD_{595} 处的吸光值。具体方法参照试剂盒说明书。

1.8 SDS-PAGE 蛋白质电泳

取 20 μ L 菌液/酶液于 2 mL EP 管,加入等体积的上样缓冲液,100℃ 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清进行 SDS-PAGE 电泳,蛋白质电泳采用金斯瑞 ExpressPlus™ 预制胶(分离胶浓度 10%(V/V),浓缩胶 5%(V/V),电泳仪/槽使用 Bio-Rad - PROTEAN (II/3/Tetra System) Hoefer Mighty Small(SE250/SE),电泳条件:电压 120 V,起始电流 75~100 mA,结束电流 30~50 mA,时间 1.0 h,电泳结束后用考马斯亮蓝染色,洗脱后观察。

1.9 重组酶活力测定和酶学性质分析

1.9.1 酶活力测定

采用 3,5-二硝基水杨酸法(DNS 法),反应体系及方法:取适当稀释的酶液 100 μ L,添加至 400 μ L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 值为 4.8,含质量体积比为 1%的普鲁兰糖)中,55℃ 条件下反应 10 min,加入 500 μ L DNS 终止反应后于沸水浴煮沸 5 min,冷却,用酶标仪在 540 nm 波长下检测反应液的吸光度值。

酶活单位定义:在相应条件,每分钟分解普鲁兰糖所释放的还原碳水化合物,其还原力即相当于 1 μ mol 葡萄糖所需的酶量,用 1 U 表示。

酶活力计算公式:酶活力(U/mL)= $N(OD_{540} + 0.108)/(6.619 \times 180 \times 10^{-3})$ 。其中 N 表示酶液稀释倍数;180 表示葡萄糖分子量。

普鲁兰酶比活力计算公式:普鲁兰酶的比活力(U/mg)=普鲁兰酶活力/普鲁兰酶蛋白含量。

1.9.2 最适反应温度和温度稳定性的测定

以 1%(W/V)普鲁兰糖作为底物,在 pH 值为 6.0 条件下,于不同的温度(35~70℃,梯度为 5℃)条件下测定温度对重组酶活力影响,并以最高酶活力计算各个温度下的相对酶活力,相对酶活力最高的温度就是该酶的最适作用温度。

在 pH 值为 6.0 条件下,将酶分别于 37℃,42℃,47℃,58℃,62℃,68℃ 保温 1 h 后测定酶活力,与未经处理的酶活力的比值绘制温度稳定性曲线。

1.9.3 最适反应 pH 值和 pH 稳定性的测定

以 1%(W/V)普鲁兰糖作为底物,在最适反应温度、pH 值为 3.6~6.0(每隔 0.2 个单位)的磷酸钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L)中测定重组酶的活力,并以最高酶活力计算各 pH 值下的相对酶活力,相

对酶活力最高的 pH 值即为该酶的最适作用 pH 值。

将酶在 pH 值为 3.5~7.0(每隔 0.5 个单位)的缓冲液里置 37℃ 水浴条件保温 24 h 后测定重组酶的酶活力,与未经处理的酶活力的比值绘制 pH 稳定性曲线。

1.9.4 K_m 和 V_{max} 的测定

以不同浓度的普鲁兰糖为底物,在最适的反应温度和 pH 值条件下,测定普鲁兰酶 PulB 的酶活力,参考 Malle 等^[20]的方法,利用 Lineweaver-Burk 作图法绘制 $1/V$ 与 $1/[S]$ 的双曲线图,并通过非线性回归方程计算得出重组酶的 K_m 和 V_{max} 的动力学参数。

1.9.5 金属离子对酶活力的影响

在最适 pH 值和最适温度条件下,PulB 在含有 1 mmol/L 的不同金属离子 (Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+}) 的 1% (W/V) 的普鲁兰糖溶液中作用 30 min 后,采用 DNS 法测定 PulB 酶活力,以不加金属离子的酶液作为对照,从而确定各种金属离子对普鲁兰酶活力的影响。

1.9.6 底物特异性分析

用 50 mmol/L, pH 值为 5.0 的柠檬酸-磷酸钠缓冲液配制 1% (W/V) 的普鲁兰糖、支链淀粉、 α -环糊精、直链淀粉和可溶性淀粉作为底物溶液,在最适反应条件下反应 24 h,然后将反应产物 100℃ 水浴 10 min 灭酶活,进行酶活力和 HPLC 酶水解产物分析。HPLC 测试条件:戴安 Utimat3000,自动进样器,色谱柱为 AminexHPX-87H 300 mm×7.8 mm (有机酸柱),流动相:5 mmol/L H_2SO_4 , pH 值为 2.5,柱温 45℃,进样量 10 μ L,流速 0.6 mL/min,示差检测器(Shodex),检测器温度为 45℃。

2 结果与分析

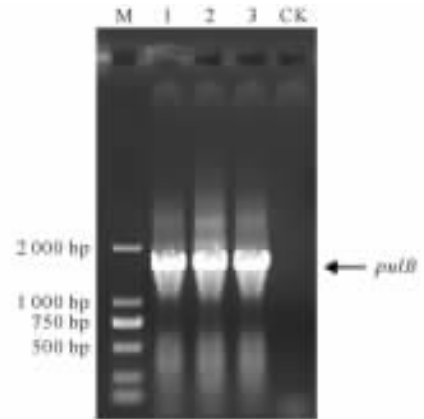
2.1 普鲁兰酶基因 *pulB* 的克隆

以 *T. flagellatus* GST4 的总 DNA 为模板,用 *pulB*-F 和 *pulB*-R 引物特异地扩增出一条大约为 1.7 kb 的 DNA 条带,大小与预期的 *pulB* 基因的编码区相符(图 1)。

2.2 *pulB* 基因序列分析和蛋白质结构预测

重组质粒 pMD-*pulB* 的普鲁兰酶基因测序结果表明,其开放读码框由 1 728 个核苷酸组成(附件 1),G+C 百分含量为 56.4%,可编码由 575 个氨基酸组成的蛋白质。该蛋白质的预计分子量为 66 672 Da,等电点 pI 为 5.25。该基因序列经 megablast

(highly similar sequences) 软件检索 GenBank 核苷酸数据库没有发现任何同源序列,说明 *pulB* 基因是一个尚未报道过的基因。



M: DL2000 DNA 分子量标记; 1~3: *pulB* 扩增产物; CK: 不加模板的空白对照

M: DL2000 DNA Marker; 1~3: *pulB* PCR product; CK: PCR without template

图 1 *pulB* DNA 片段的 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of *pulB* PCR product

在蛋白质序列上,经用 BlastX 软件检索 GenBank 氨基酸数据库发现该基因编码的产物与 *Thermicanus aegyptius* 的环麦芽糖糊精酶的氨基酸序列相似性最高,但也仅有 54% 的相似性 (Identities 为 54%, Positives 为 69%)。用 SMART 工具分析该基因编码产物的组件结构,自 N 端的第 133~490 位氨基酸为家族 GH13 糖苷键水解酶 α -淀粉酶功能域(图 2)。

2.3 重组质粒的验证

如图 3 所示,转化子经双酶切后可切出一大一小两个片段,小片段与预期的大小一致。PCR 也可扩增出同样大小的目的片段,证明重组质粒构建成功,命名为 pET-*pulB*。

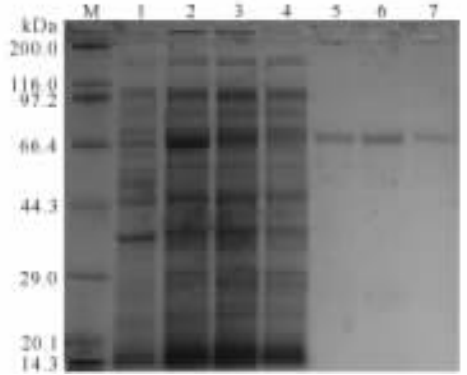
2.4 重组酶 *PulB* 的表达和纯化

如图 4 所示,粗酶液的 SDS-PAGE 电泳分析显示,在 66 kDa 位置处有较明显蛋白质特征条带出现,该蛋白质大小与基因序列推测所得的理论分子大小相符,初步认定该蛋白质即为异源表达的普鲁兰酶 PulB。酶活力测试结果显示该重组菌具有普鲁兰酶活力,总酶活力最高可达 78 U/mL。由此可推断异源表达成功。

上清经 Ni-NTA 柱进行蛋白质纯化,得到纯度在 90% 以上的蛋白质(图 4)。经过酶活力测定,纯化后的酶具有普鲁兰酶活力,比活力为 258 U/mg。



均有很好的稳定性,相对酶活力均保持在 60% 以上。



M:蛋白质分子量标记;1:IPTG 诱导前的 BL21/pET-*pulB*;2~3:IPTG 诱导后的 BL21/pET-*pulB*;4:BL21/pET-22b(+);5~7:纯化的 PulB 蛋白质

M: Protein Marker; 1: Before IPTG induction of BL21/pET - *pulB*; 2 ~ 3: After IPTG induction of BL21/pET- *pulB*; 4: BL21/pET-22b (+); 5 ~ 7: Purified PulB

图 4 PulB 蛋白表达产物和纯化蛋白质的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of PulB expression in BL21 and purified PulB

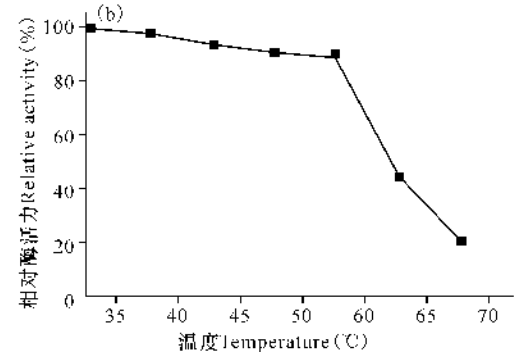
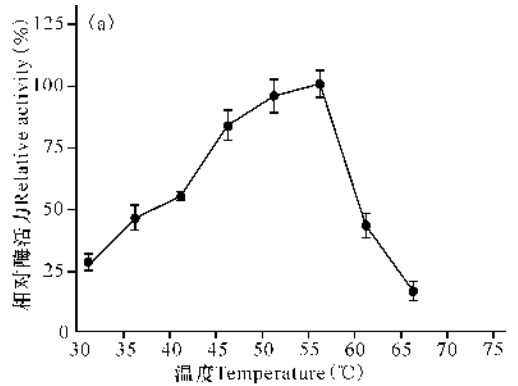
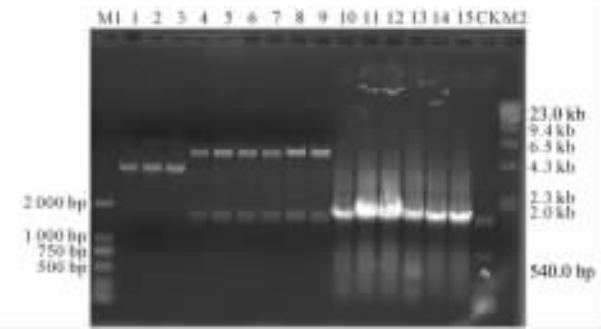


图 5 PulB 的最适反应温度和热稳定性

Fig. 5 The optimal temperature and thermostability of PulB

图 2 *pulB* 的组件结构(红色代表 α -amy 的功能域)

Fig. 2 Modular architecture of *pulB*(The red mark represents α -amy domain)



M1:DL2000 分子量标记;M2: λ /*Hind* III 分子量标记; CK:以空质粒为模板的空白对照;1~3:重组质粒 pET-*pulB*;4~9:双酶切验证;10~15:PCR 验证

M1:DL2000 DNA Marker; M2: λ /*Hind* III DNA Marker; CK:PCR with pET-22b (+) as template; 1~3: recombinant plasmid pET- *pulB*; 4 ~ 9: pET- *pulB* digested with *Bam*H I 和 *Hind* III ; 10~15: *pulB* PCR product

图 3 pET-*pulB* 重组质粒验证

Fig. 3 Verification of recombinant plasmid pET-*pulB*

2.5 重组酶 PulB 的酶学性质

2.5.1 最适反应温度和温度稳定性

由图 5a 可知,55°C 时 PulB 酶活力达到最高,以该值作 100% 的酶活力,则 45°C 时 PulB 相对酶活力为 78%,65°C 相对酶活力超过 15%。PulB 在 55°C 以下均十分稳定,保温 4 h 后基本保留 80% 以上的酶活力,但超过 60°C 酶失活速度加快,70°C 保温 4 h 后酶活力基本丧失(图 5b)。

2.5.2 最适反应 pH 值和 pH 稳定性

由图 6a 可知,重组酶 PulB 最适作用 pH 值为 5.0,当 pH 值分别为 4.6,4.8 和 5.4 时,PulB 的相对酶活力分别为最适 pH 值条件下的 5%、25% 和 75%,即在较低 pH 值条件下,PulB 酶活力下降比较大。由图 6b 可知,PulB 在 pH 值为 4.5~5.5 时

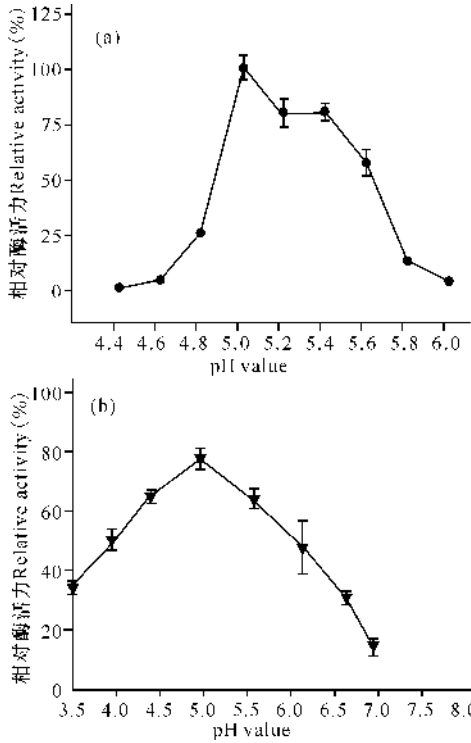


图6 PulB的最适反应 pH 值和 pH 稳定性

Fig. 6 The optimal pH and pH stability of PulB

2.5.3 K_m 和 V_{max} 的测定

不同来源的酶由于作用的底物不同,其 K_m 值和 V_{max} 也不一样, K_m 大致范围在 10^{-6} 到 10^{-1} mol/L 之间。陆雁^[21]从地衣芽孢杆菌中克隆到低温普鲁兰酶,经表达获得的重组酶的 K_m 值为 14.29 mmol/L, V_{max} 值为 $18.08 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。秦艳^[22]将长野芽孢杆菌普鲁兰酶基因在大肠杆菌中表达,获得的重组酶的 K_m 值为 3.84 mg/mL, V_{max} 值为 $31.25 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。本文研究的来自膨胀芽孢杆菌的重组酶对普鲁兰糖的 $K_m = (16.28 \pm 0.03) \text{mg/mL}$, $V_{max} = (22.05 \pm 0.02) \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (图 7),属于中等水平,这可能与此野生菌的生存环境条件温和,无极端环境条件等因素有关。

2.6 金属离子对重组酶 PulB 水解活性的影响

如图 8 所示,所有金属离子对 PulB 都没有明显的促进作用, Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 对酶活力有明显的抑制作用,其中 Cu^{2+} 的抑制作用可使酶基本失活, Ba^{2+} 对酶活力的抑制作用则相对比较小,而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 则对酶活力几乎不产生影响。

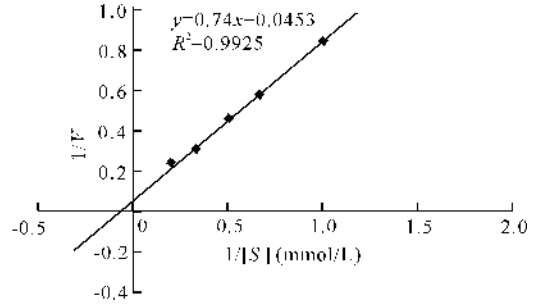


图7 PulB的米氏常数分析

Fig. 7 Analysis of Michaelis constants of PulB

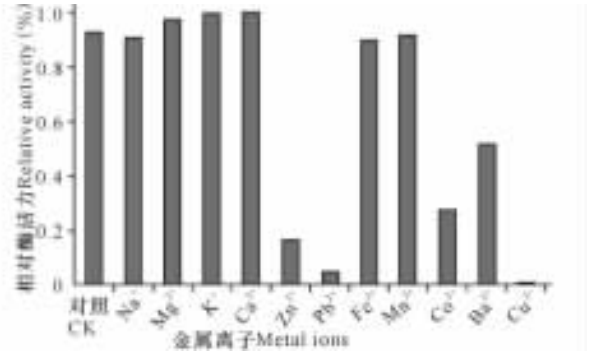


图8 不同金属离子对 PulB 的影响

Fig. 8 The effect of different metal ions on PulB

2.7 重组酶 PulB 的底物特异性分析

如图 9 所示,PulB 水解普鲁兰糖产生的三糖产物的色谱峰与麦芽三糖标准品的峰的保留时间一致,约为 8.003 min,表明 PulB 通过内切方式水解普鲁兰糖,得到的终产物为三糖。由表 1 可知,PulB 能够水解支链淀粉、可溶性淀粉和 α -环糊精,它可水解这些底物中分支链中的 α -1,6-糖苷键,也可以将最小单位的支链分解,但不能水解直链淀粉,说明 PulB 能特异性水解 α -1,6-糖苷键,不能作用 α -1,4-糖苷键。因此,PulB 的催化分类属于 I 型普鲁兰酶。

表 1 重组普鲁兰酶 PulB 的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of recombinant pullulanase PulB

底物 * Substrate	相对酶活力 Relative activity (%)	比活力 Specific activity (U/mg)
普鲁兰糖 Pullulan	100	258.0 ± 0.5
可溶性淀粉 Soluble starch	48	125.0 ± 0.4
支链淀粉 Amylopetin	57	149.5 ± 0.5
α -环糊精 α -cyclodextrins	68	176.0 ± 0.5
直链淀粉 Amylose	—	—

注:*,以普鲁兰糖为底物测得的酶活力为 100%

Note:*,the activity for pullulan was defined as 100%

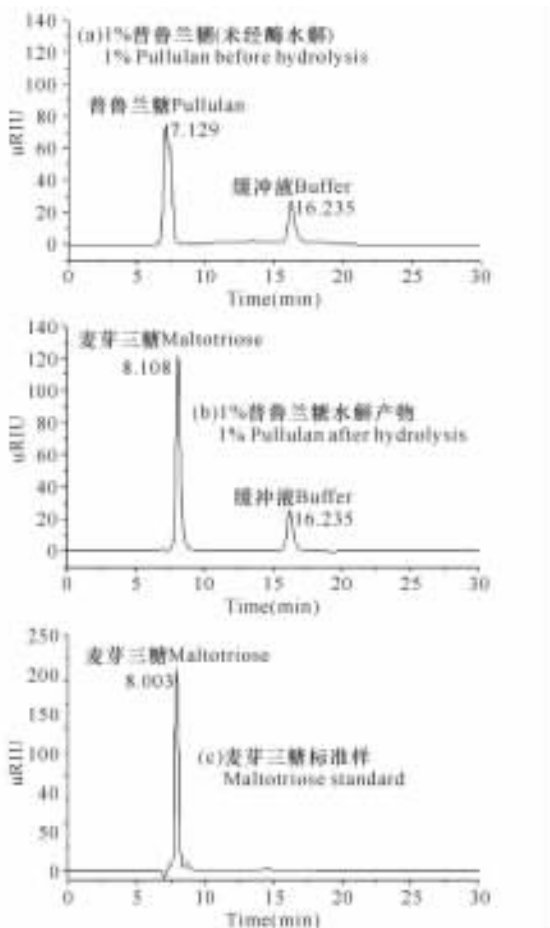


图9 PulB水解普鲁兰糖产物的HPLC分析

Fig. 9 HPLC analysis on the products of pullulan hydrolyzed with PulB

3 讨论

普鲁兰酶是重要的淀粉水解酶家族成员之一,近年国外对普鲁兰酶的研究比较深入,已从普鲁兰酶结构和功能的关系、普鲁兰酶的定位和分泌机制、结构指导的普鲁兰酶定点突变等方面进行研究^[23-24]。国内研究者对酶分子水平上进行改造以获得酶学性质更优的突变酶的研究则比较少,主要是对产酶菌种的筛选及其基因的克隆和异源表达。各国科研人员从来源于不同地区和环境的微生物中获得普鲁兰酶^[25-26],但许多酶的酶学性质依然不能满足实际应用的要求,因此需要寻找更多酶学性质更好的产生菌种。

虽然人们已获得产普鲁兰酶的基因工程菌,但普鲁兰酶表达水平及其酶学性质仍有不足,且有的重组质粒在宿主菌中的稳定性不够理想。因此,今后的研究工作一方面可借助启动子改造、信号肽选择、翻译起始区优化等手段构建优良重组质粒,实现重组菌普鲁兰酶的高效表达;另一方面,可以采用定

向进化等手段对普鲁兰酶进行分子改造,以进一步改善其酶学特性,如提高酶对底物的亲和力、酶的热稳定性和酸碱耐受性等^[27-28]。若能通过上述手段获得耐高温耐酸的普鲁兰酶高产重组菌株,将会对淀粉加工业及相关领域产生深远的影响。

在工业应用上,酶的耐热和耐酸性是重要指标。本研究普鲁兰酶 PulB 的最适反应温度为 55℃,最适反应 pH 值为 5.0,在较窄的酸性 pH 值范围内(4.5~5.5)较稳定,与目前工业上应用的诺维信公司的嗜酸芽孢杆菌普鲁兰酶的性质比较接近,这些特点也接近目前淀粉加工的生产条件,但仍需进一步改造使其耐酸和耐热性提高才可满足应用的需要。

4 结论

本研究采用 pET 系统实现了 *T. flagellatus* GST4 新型普鲁兰酶基因 *pulB* 在大肠杆菌中的可溶性表达,发酵液上清酶活力达到 78 U/mL,粗酶液经纯化后比活力为 258 U/mg,比原始菌的酶活力高 15 倍。其最适反应温度和 pH 值分别为 55℃ 和 5.0,在低于 55℃ 的温度范围和较窄的酸性范围内(4.5~5.5)具有良好的稳定性,可专一性地水解淀粉和普鲁兰糖中的 α -1,6-糖苷键,对普鲁兰糖有较强的底物特异性。酶学性质分析表明,重组普鲁兰酶 PulB 可用于木薯淀粉生产酒精的水解糖化(作用温度 60℃、pH 值为 4.5~5.5)过程,具有一定的工业化应用价值。

重组普鲁兰酶 PulB 的 DNA 序列和 GenBank 数据库里的任何序列都没有同源性,是尚未报道的新型普鲁兰酶,具有较高的创新性和学术研究价值。通过蛋白质的结构域预测和 SMART 分析发现, PulB 具有淀粉酶的结构域,它可水解普鲁兰糖、支链淀粉、可溶性淀粉和 α -环糊精等,属 I 型普鲁兰酶。

参考文献:

- [1] HUI S L, TAN J S, LING T C, et al. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications[J]. *Enzyme Res*, 2012, 2012: 921-362.
 - [2] 莫莉, 韦廷宗, 闭海, 等. 支链淀粉水解酶水解支链淀粉的特异氨基酸分析[J]. *广西科学*, 2015, 22(1): 31-36, 43.
- MO L, WEI T Z, BI H, et al. Analysis of the key amino acid of amylopectin hydrolase on amylopectin hydrolysis[J]. *Guangxi Sciences*, 2015, 22(1): 31-36, 43.

- [3] 乔宇,丁宏标,王海燕,等. 普鲁兰酶的研究进展[J]. 生物技术进展,2011,1(3):189-194.
QIAO Y,DING H B,WANG H Y,et al. Research advances in pullulanase[J]. Current Biotechnology,2011,1(3):189-194.
- [4] 董桂秀,杨平平,毛朝相,等. 普鲁兰酶的研究进展[J]. 安徽农业科学,2012,40(18):9874-9877.
DONG G X,YANG P P,MAO C X,et al. Research progress on pullulanase[J]. Journal of Anhui Agri Sci,2012,40(18):9874-9877.
- [5] WALLENEFLS K,BENDER H,RACHED J R. Pullulanase from *Aerobacter aeorgenes*: Production in a cell-bound state. Purification and properties of the enzyme [J]. Biochem Biophys Res Commun,1966,22(3):254-261.
- [6] YOSHIYUKI TAKASKAI. Purifications and enzymatic properties of α -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var *myeoides*[J]. Agr Biol Chem,1976,40(8):1515-1530.
- [7] JENSEN B F,NORMAN B E. *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase; Application and regulatory aspects for use in the food industry [J]. Process Biochem,1984,19:351-369.
- [8] DEWEER P,AMORY A. Pullulanase Producing Microorganisms:5817498[P]. 1998-10-06.
- [9] TOMIMURA E,ZEMAN N W,FRANKIEWICZ J R,et al. Description of *Bacillus naganoensis* sp. nov. [J]. Int J Syst Bacteriol,1990,40(2):123-125.
- [10] TOMIMURA E. Thermoduric and Aciduric Pullulanase Enzyme and Method for its Production:5055403 [P]. 1991-10-08.
- [11] HYUN H H,ZEIKUS J G. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* [J]. Appl Environ Microbiol,1985,49(5):1168-1173.
- [12] 韩鹏,周鹏,闫巧娟,等. 嗜热枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因的表达与重组酶的性质[J]. 微生物学通报,2011,38(12):1755-1761.
HAN P,ZHOU P,YAN Q J,et al. Expression of a pullulanase gene from the thermophilic *Bacillus subtilis* and characterization of therecombinant enzyme[J]. Microbiology China,2011,38(12):1755-1761.
- [13] 杨娟娟. 普鲁兰酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[D]. 昆明:云南师范大学,2005.
YANG Y J. Cloning and Overexpression of Gene Encoding the Pullulanase from *Bacillus naganoensis* in *Pichia pastoris* [D]. Kunming: Yunnan Normal University,2005.
- [14] WANG Q Y,XIE N Z,QIN Y,et al. *Tumebacillus flagellatus* sp. nov., an α -amylase/pullulanase-producing bacterium isolated from cassava waste water[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2013,63:3138-3142.
- [15] SAMBROOK J,RUSSELL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京:科学出版社,2002.
SAMBROOK J,RUSSELL D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press,2002.
- [16] LETUNIC I,DOERKS T,BORK P. SMART 6:Recent updates and new developments[J]. Nucleic Acids Res,2009,37:229-232.
- [17] SCHULTZ J,MILPETZ F,BORK P,et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains[J]. Proc Natl Acad Sci, USA,1998,95(11):5857-5864.
- [18] LILIUS G,PERSON M,BU L,et al. Metal affinity precipitation of proteins carrying genetically attached poly histidine tails[J]. Eur J Biochem,1991,198(2):499-504.
- [19] 汪家政. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2002.
WANG J Z. The Technical Manuals of Protein[M]. Beijing: Science Press,2002.
- [20] MALLE D,ITOH T,HASHIMOTO W,et al. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168 [J]. Acta Crystallogr,2006,62:381-384.
- [21] 陆雁. *Bacillus licheniformis* 普鲁兰酶基因的克隆表达及分子改造[D]. 南宁:广西大学,2012.
LU Y. Cloning, Expression and Molecular Modification of Pullulanase Gene from *Bacillus licheniformis* [D]. Nanning: Guangxi University,2012.
- [22] 秦艳. 普鲁兰酶突变体及优良酿酒酵母工程菌的构建[D]. 南宁:广西大学,2014.
QIN Y. Construction of Pullulanase and Genetic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* Strain [D]. Nanning: Guangxi University,2014.
- [23] EAST A,MECHALY A E,HUYSMANS G H,et al. Structural basis of pullulanase membrane binding and secretion revealed by X-ray crystallography, molecular dynamics and biochemical analysis [J]. Structure,2016,24(1):92-104.
- [24] MØLLER M S,ABOU HACHEM M,SVENSSON B,et al. Structure of the starch-debranching enzyme barley limit dextrinase reveals homology of the N-

- terminal domain to CBM21[J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2012, 68 (9): 1008-1012.
- [25] ZHANG Y, LIU Y H, LI Y, et al. Extracellular expression of pullulanase from *Bacillus nagoensis* in *Escherichia coli* [J]. Ann Microbiol, 2013, 63 (1): 289-294.
- [26] 乔宇. I 型普鲁兰酶产生菌的筛选及其基因克隆、分子改造和高密度发酵表达研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- QIAO Y. Study on Screening of Type I Pullulanase Producing Bacteria and its Gene Cloning, Molecular Modification, and Expression in the High Density Fermentation[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [27] SONG W, NIE Y, MU XQ, et al. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus nagoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis*; Effects of promoter and host [J]. Protein Expr Purif, 2016, 4 (16): 30055-30059.
- [28] CHEN A, LI Y, NIE J, et al. Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using in silico data driven rational design methods[J]. Enzyme Microb Technol, 2015, 78: 74-83.

(责任编辑:陆雁)

附件 1: *pulB* 基因的核苷酸序列

Attachment 1: The nucleotide sequence of the *pulB* gene

atgaatcaggaagctattttcacatgtctcacggcgctacgcgtacgcgtgggaccgcatcatgcgtgatcaaaactcgcgccaagcgcg
gagactgaaatcggatcatatggtgcacgaagaccgctcgaactgcccgctcttatgcaactcaagaattgaactacgcgggttcagatg
aatfttatgattactttacagcgggtggtggagacgagaacgcggaagctccgctaccgcttttgggacaacgggcccggagcagtattgta
cggggagcgggctctcgaacatcgccgatttcgccggtggtccaactggcgacttgcgaaccgcgactgttcggtgattccggagtg
ggcgaagagtgccggtggtctatcagatctcccgaccgctccaaaacgggaatccggacaacgatccggaaggcgtgcgtccgtggg
cgagtgccgacgcccatacgtttttggcgggattgcaagggatttggacagactcccgtacttggagaactgggctcaactgatct
acatgacgccgatctctgtcgcctccacgcacaagtatgacacggccgattactacgcgatcgaccgatgttggcgatgtggagacgtt
gaagcgttgggtggagaacgcgcacgttcgcggatccgcgtgatgctcgcgcccgttcaaccattcgggtgcggagtctccgcttcca
agacgtttggcgaagggggagggcgtccgagtagccgactggttccacattcagacttccggctgatcaggaagtgaattacgaga
cgtttccaaccatgtggcgtcgtatgccgaaattgcgcacggagaatccaacgtgcgcgattatctgctggatgtggcggagtttgggtga
aggaagtagggatcgacggttggcgtcgcacgtggccaacgaagtcgatcacgcgttctggcgcgcttcccgatcgggtgcgcgagg
cgaaccggagacgttgatcatcgccgaggtgtggcatgactgctgccttgggtgcaaggagatcaattcagcggcgtgatgaactacctgt
tcccgatcgggtgattgagttttgcaaagcggacgatcagcgcggatcgtttgatcgcgatgctgacaaaacgcggatgatgtacaagc
gtcaagcgaactcatgatgttcaacttctgggagcctatgacacggcgcgtttttgacgatctgcaacggcgtggaagagcgcgatgcgtt
ggcgggtggttccagatgacctatgtgggattccggaagtgtactacggcgacgaagtggcgtggtcggagagaacgaccggattgc
cgccggacgatgatctgggaagaggagaagcagaaccgaggtgttccgctccatcaacagttgatctctgttcgaaaagcgcattccggc
cttgcaaacggctgtatcgcgcgggtggacaagacgcctgcacaatctctacgggttgttcgcgagacggagaacgagtcgatctacat
cttgcttaacaacggcagcggcaaccactgggtgctcctccggaagggtgaagcggcgggatctgttgaccgatcgggtgtacagcggc
acgttcgatctggagtcgtacggttccgacttctctgttgagcggcggaaacgggtgtag。