

地衣芽孢杆菌生麦芽糖 α -淀粉酶的基因克隆与鉴定^{*}

訾楠 沈微 石贵阳 王正祥^{**}

(江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘要 以地衣芽孢杆菌ATCC14580基因组DNA为模板, PCR扩增出1.7 kb大小的麦芽糖淀粉酶基因 amyM , 克隆入表达载体pET-28a(+), 转化*Escherichia coli* BL21 (DE3), 经IPTG诱导, 测定麦芽糖淀粉酶酶活性. 结果表明, 麦芽糖淀粉酶基因 amyM 获得了活性表达, 酶活力为3.797 U/mL, SDS-PAGE电泳结果显示相对分子质量约为 67×10^3 的特异性蛋白质条带. 酶学性质分析表明, 重组麦芽糖淀粉酶的最适反应温度为45 °C, 最适反应pH为6.5, 在45 °C以下的中低温环境保持稳定, 且能在比较宽的pH范围内(pH 4.5~8.5)稳定. 图3 表1 参16

关键词 地衣芽孢杆菌; 生麦芽糖 α -淀粉酶; 基因克隆; 酶学性质

CLC TQ925.1 : Q785

Gene Cloning and Characterization of *Bacillus licheniformis* Maltogenic α -amylase^{*}

ZI Nan, SHEN Wei, SHI Guiyang & WANG Zhengxiang^{**}

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education of China, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract The gene amyM was amplified by the method of PCR with genomic DNA of *Bacillus licheniformis* ATCC14580 as template, and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) by yielding hybrid plasmid pET-28a- amyM . Induced with IPTG, the *E. coli* (DE3) harboring pET-28a- amyM successfully expressed the active maltogenic α -amylase, and the enzyme activity was 3.797 U/mL. The recombinant maltogenic α -amylase showed a molecular mass of 67×10^3 by SDS-PAGE. The recombinant enzyme showed an activity optimum at 45 °C and pH at 6.5. It was stable below 45 °C after incubated at pH 6.5 for 1 h and stable at pHs ranging from 4.5 to 8.5. Fig 3, Tab 1, Ref 16

Key words *Bacillus licheniformis*; maltogenic α -amylase; gene cloning; enzymatic property

CLC TQ925.1 : Q785

生麦芽糖 α -淀粉酶(Maltogenic α -amylase, MAase), 俗称麦芽糖淀粉酶, 全称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], 是一类水解 α -1,4-D-葡萄糖苷键的内切淀粉酶, 作用于淀粉及相关多聚糖、寡糖, 产物为 α -麦芽糖. 麦芽糖单位从淀粉链的非还原末端按顺时针方向被水解下来^[1]. 麦芽糖淀粉酶与环状麦芽糊精淀粉酶、新普鲁兰酶(Neopullulanase)和*Thermoactinomyces vulgaris* II型淀粉酶同属于淀粉分解酶类亚族GH13^[2~5].

麦芽糖淀粉酶非常独特, 不同于典型的淀粉酶, 它不但可快速水解利用直链淀粉或环状糊精, 也能少量利用支链淀粉^[6~8], 具有多底物特性; 而且还具有转糖基作用^[1]. 另外, 麦芽糖淀粉酶还能水解阿卡波糖(Acarbose, 一种 α -淀粉酶的有效抑制剂), 但这与菌种相关^[2]. 麦芽糖淀粉酶基因主要来源于芽孢杆菌和放线菌, 如枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、栖热菌属、嗜热放线菌等.

麦芽糖淀粉酶作为一种新型的酶制剂, 主要用于淀粉及食品烘焙工业: 在食品行业中, 由于其独特的抗老化作用, 可用于延长焙烤食品的货架期; 在淀粉行业, 可单独或与一种

支链淀粉脱支酶一起用于生产高麦芽糖浆.

目前, 国外关于微生物来源的麦芽糖淀粉酶的研究已经向分子生物学水平深入进行, Kim Do Yeon等将一株*Bacillus subtilis* SUH4-2的麦芽糖淀粉酶基因在*B. subtilis* 168 中表达并对其启动子功能进行研究^[1]; Park K H等研究了嗜热脂肪芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶的转糖基作用方式与机理^[2]; Liu Bin等对来源于深海嗜热芽孢杆菌的麦芽糖淀粉酶基因进行克隆并在*E. coli*中与谷胱甘肽S-转移酶实现融合表达^[5]; Aubrey Jones等对*Bacillus* sp. TS-25来源的麦芽糖淀粉酶进行了分子进化方面的研究^[9]. 但国内相关研究几乎是空白. 随着酶工业的不断发展以及人们对麦芽糖质量的更高要求, 应用酶制剂生产麦芽糖浆已成为研究的热点. 国外几家大型酶制剂公司已有麦芽糖淀粉酶面世, 但价格昂贵; 而国内基本靠进口, 大大增加了生产成本. 所以麦芽糖淀粉酶作为一种较新的酶制剂, 有必要对其加以深入系统的研究. 本文报道了地衣芽孢杆菌来源的生麦芽糖 α -淀粉酶基因的克隆和异源表达, 并对重组酶的酶学性质及水解淀粉产物进行了系统的分析.

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) ATCC14580、*E. coli* XL-1、*E. coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3)、质粒pBlueScript II SK(-)和pET-28a(+)均由江南大学中国高校工业微生物资源和

收稿日期: 2008-01-30 接受日期: 2008-03-31

^{*}国家高技术研究发展计划“863”项目(No. 2006AA020204)资助
Supported by the State High-Tech Development Project of China (“863” Program, No. 2006AA020204)

^{**}通讯作者 Corresponding author (E-mail: zxwang@jiangnan.edu.cn)

信息中心(<http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn>)保藏. 重组质粒pSK-amyM、pET-28a-amyM为本研究中构建.

1.2 培养基和培养条件

细菌的培养采用LB培养基(蛋白胨1%、酵母粉0.5%、NaCl 1%), 添加1.5%琼脂粉即为固体培养基. 抗性筛选时补加终浓度为30 $\mu\text{g/mL}$ 的卡那霉素(Km)或终浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素(Amp). 培养在37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行.

1.3 DNA的提取和纯化

B. licheniformis ATCC14580的基因组DNA提取、纯化以及研究中质粒的提取参见文献[10].

1.4 *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶基因amyM的克隆

根据*B. licheniformis* ATCC14580基因组序列(GenBank: CP000002)中的麦芽糖淀粉酶基因序列, 设计合成如下引物:

引物Bli1: 5'-CATGAATTCATGATGGAATATGCAGC-GATACATCATC-3';

引物Bli2: 5'-TAAGAATTCTTAGACCGCCCCCAA-AATGAAAAA-3'.

以*B. licheniformis* ATCC14580的染色体DNA为模板进行PCR扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min.

1.5 重组表达质粒pET-28a-amyM的构建

将amyM基因的PCR产物克隆入pBlueScript II SK(-)的Sma I位点, 得到重组质粒pSK-amyM. 再将胶分离所得的amyM片段插入到pET-28a(+)的EcoR I位点, 构建成重组表达质粒pET-28a-amyM. 用CaCl₂法^[10]转化表达宿主菌*E. coli* BL21 (DE3), 实现麦芽糖淀粉酶基因amyM的表达.

1.6 麦芽糖淀粉酶酶活力的测定方法

取1 mL用pH 6.5的Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制的1% (w)可溶性淀粉溶液, 以45 $^{\circ}\text{C}$ 预热2 min后加入50 μL 酶液, 于45 $^{\circ}\text{C}$ 保温反应10 min, 加入1 mL DNS煮沸反应5 min, 于540 nm处测定吸光值, 计算产生的还原糖量. 一个酶活力单位(U)定义为在上述反应条件下, 每分钟催化水解淀粉生成等价于1 μmol 麦芽糖的还原糖所需的酶量. 大肠杆菌蛋白的制备采用超声破碎法, 按照文献[12]进行.

1.7 麦芽糖淀粉酶酶学性质分析

1.7.1 酶最适作用温度和温度稳定性的测定 pH 6.5时, 在不同温度条件下(25~70 $^{\circ}\text{C}$)测定AmyM的酶活力, 得到温度-酶活力曲线, 确定酶的最适作用温度; 测定酶的温度稳定性时, 在pH 6.5条件下, 将酶液在不同温度下分别保温1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为100%, 得到温度-稳定性曲线.

1.7.2 酶最适作用pH和pH稳定性的测定 在最适温度45 $^{\circ}\text{C}$ 下, 用不同pH缓冲液(pH 4.0~7.0, Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液; pH 7.5~8.5, Na₂HPO₄-KH₂PO₄缓冲液; pH 9.0, Gly-NaOH缓冲液)配制1% (w)可溶性淀粉底物溶液, 测定AmyM的酶活力, 得到pH-酶活力曲线, 确定酶的最适作用pH; 室温下, 将酶液在不同pH条件下分别保温1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为100%, 得到pH-稳定性曲线.

1.7.3 化学试剂对酶活力和酶热稳定性的影响 不同金属离子、添加剂和表面活性剂对酶活力的影响以及化学试剂对酶稳定性的影响均在标准条件下测定, 以未处理的原酶液活力为100%. 实验中选用了两种对酶有激活作用的金属离子(Mn²⁺、Mg²⁺)和一种常用的金属离子(如Ca²⁺, 浓度为10 mmol/L), 以此检测金属激活离子和常用离子对酶热稳定性的影响.

1.8 蛋白质测定和SDS-PAGE电泳

蛋白质浓度测定: 采用Bradford法^[13], 以牛血清白蛋白BSA作为标准. SDS-PAGE参照文献[11]进行.

1.9 麦芽糖淀粉酶水解淀粉产物的硅胶板薄层色谱分析法

按照文献[14]的方法进行.

1.10 麦芽糖淀粉酶水解淀粉产物的高压液相色谱分析法

色谱柱: NH₂-柱; 检测器: 示差检测器; 流动相: 60%乙腈(色谱纯); 流速: 1 mL/min; 柱压: 82 $\times$ 10⁵ Pa.

2 结果与分析

2.1 *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶基因amyM的克隆和序列测定

以*B. licheniformis* ATCC14580染色体DNA为模板, Bli1、Bli2为引物, 在Pfu DNA多聚酶的作用下, PCR扩增出1.7 kb左右的amyM基因片段, 与预计基因大小相符. 将此PCR产物克隆入载体pBlueScript II SK(-), 得到重组质粒pSK-amyM; 再将胶分离的amyM片段插入到载体pET-28a(+)的EcoR I位点, 得到重组表达质粒pET-28a-amyM, 并进行核苷酸序列测定确认. 经测定, amyM序列大小为1 737 bp, 编码578个氨基酸, 预计蛋白M_r为67 $\times$ 10³.

2.2 *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶基因amyM在*E. coli* BL21 (DE3)中的表达

将重组质粒pET-28a-amyM转化*E. coli* BL21 (DE3), 用LB培养基在37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下摇瓶振荡培养. 当培养液菌体浓度D_{600 nm}为0.8左右时, 添加IPTG(终浓度为0.5 mmol/L)诱导培养4 h. 以8000 r/min离心15 min收集菌体, 以磷酸盐缓冲液洗涤悬浮, 超声处理破碎细胞. 破碎液以8 000 r/min离心20 min, 取上清测定酶活, 以含空载体pET-28a的*E. coli* BL21 (DE3)菌株裂解液为相应空白对照. 结果表明, 经IPTG诱导的重组菌的细胞破碎液具有麦芽糖淀粉酶活性, 其活力为3.797 U/mL培养液, 空白对照细胞的破碎液没有麦芽糖淀粉酶活性. 我们同时也同时测定了培养液中的酶活, 结果表明培养上清液中没有酶活.

SDS-PAGE结果(图1)表明, 经IPTG诱导后, 麦芽糖淀粉酶基因在*E. coli* BL21 (DE3)中得到了较好的表达, 在67 $\times$ 10³附近出现了明显的蛋白条带, 与理论推导的AmyM相对分子质量相一致.

2.3 重组麦芽糖淀粉酶AmyM的基本性质

2.3.1 温度和pH对酶活力和酶稳定性的影响 pH 6.5时, 在不同温度条件下测定AmyM的酶活力, 得到温度-酶活力曲线(图2), 结果显示酶的最适反应温度为45 $^{\circ}\text{C}$; 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 在不同pH条件下测定AmyM的酶活力, 获得pH-酶活力曲线(图3),

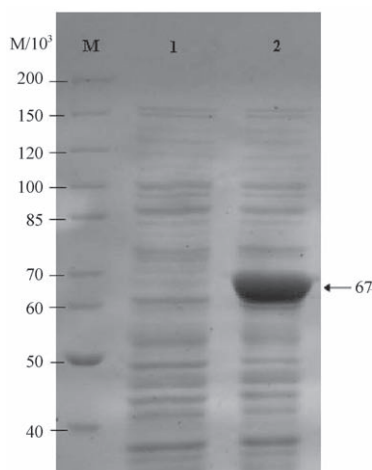


图1 重组大肠杆菌表达AmyM的SDS-PAGE分析

Fig. 1 SDS-PAGE of the AmyM from *E. coli* DE3 (pET-28a-amyM)

M: 分子量标准. 1: 空白对照 *E. coli* DE3 (pET-28a); 2: *E. coli* DE3 (pET-28a-amyM)

M: Molecular mass marker. 1: *E. coli* DE3 (pET-28a); 2: *E. coli* DE3 (pET-28a-amyM)

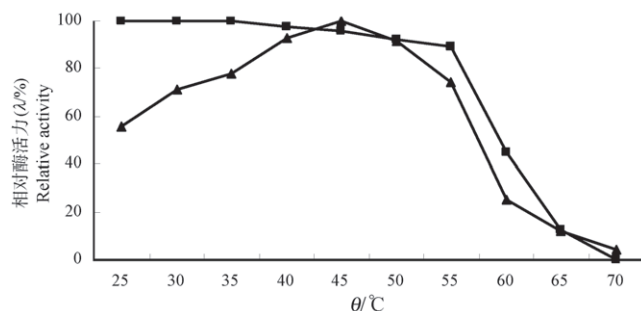


图2 温度对重组麦芽糖淀粉酶活力和稳定性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the recombinant maltogenic amylase activity and stability

▲: Temperature-activity diagram; ■: Temperature-stability diagram

酶的最适反应pH为6.5. 将酶液在不同温度下分别保温1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为100%, 得到温度-稳定性曲线(图2). 结果显示, AmyM在高温下不稳定, 在45 °C以下能保持稳定. 室温下, 将酶液在不同pH条件下分别保温1 h, 测定残余酶活力, 以未处理的原酶液活力为100%, 得到pH-稳定性曲线(图3). 结果显示, AmyM在4.5~8.5之间保持稳定. 这说明该酶能在比较宽的pH范围内稳定存在, 且能在中低温环境下保持稳定.

2.3.2 化学试剂对酶活力和酶热稳定性的影响 化学试剂对酶活力的影响如表1所示. 在试验浓度下, 金属离子Li⁺、Mg²⁺、Mn²⁺和表面活性剂Triton X-100对重组酶AmyM具有激活作用, 其中Mn²⁺和Triton X-100作用效果最显著; Zn²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺和SDS、EDTA、Tween20对重组酶AmyM具有抑制作用, Ca²⁺、Fe³⁺、EDTA、Tween20抑制作用微弱, Zn²⁺、Cu²⁺、SDS抑制作用显著, Cu²⁺抑制作用最强.

金属离子对酶热稳定性的影响如下: 两种对重组酶AmyM有激活作用的金属离子Mn²⁺、Mg²⁺对酶的热稳定性没有正向影响, 反而使其稳定性降低, 在40 °C时酶活开始明显下降, 50 °C时酶活完全丧失. 这说明金属激活离子只能对重

组酶起激活作用而不起保护作用. 另外也考察了淀粉酶常用保护离子Ca²⁺对重组麦芽糖淀粉酶热稳定的影响, 结果显示Ca²⁺也会使其稳定性降低, 不能起保护作用.

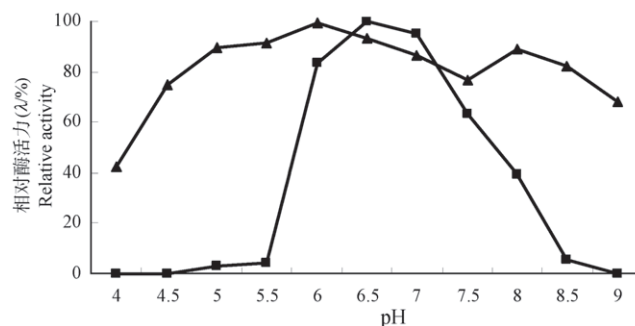


图3 pH值对重组麦芽糖淀粉酶活力和稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the recombinant maltogenic amylase activity and stability

■: pH-activity diagram; ▲: pH-stability diagram

表1 化学试剂对重组麦芽糖淀粉酶酶活力的影响

Table 1 Effect of chemical reagents on the recombinant maltogenic amylase activity

金属离子/添加剂 Metal ion/additive	c/mmol L ⁻¹	相对酶活力 Relative activity (λ/%)
原酶液 None	-	100
LiCl	1	109.6
	10	128.9
MgCl ₂	1	109.6
	10	119.7
ZnCl ₂	1	91.6
	10	25.6
CuCl ₂	1	0
	10	0
CaCl ₂	1	85.2
	10	51.3
MnCl ₂	1	113.4
	10	156.4
FeCl ₃	1	97.1
	10	84.2
SDS	1	40.0
	10	4.0
EDTA	1	94.5
	10	83.7
Tween20	0.1	86.1
	1	66.9
Triton X-100	0.1	116.1
	1	154.2

2.4 重组麦芽糖淀粉酶AmyM的水解性质

2.4.1 重组酶的底物特异性 分别以1%可溶性淀粉、β-环状糊精、普鲁兰多糖为底物, 于标准条件下测定相对酶活力, 以可溶性淀粉为底物时测得的酶活力为100%. 结果显示, 重组酶AmyM可以很好地利用可溶性淀粉和β-环状糊精, 但只能少许利用普鲁兰, 水解可溶性淀粉、β-环状糊精、普鲁兰多糖的相对酶活力分别为100%、127%、20%, 说明最适底物为β-环状糊精.

2.4.2 重组酶水解产物的分析 以1%可溶性淀粉为底物, 按照1:10的比例加入AmyM粗酶液, 混匀后于45℃、pH 6.5条件下保温反应不同时间(12 h、24 h、36 h、48 h、72 h); 同时以空白(含空载体的*E. coli* DE3的细胞破碎液)作为对照, 在相同条件下反应相同时间, 分别取样用硅胶板薄层色谱法和HPLC的方法对产物进行分析, 考察重组麦芽糖淀粉酶的反应能力。结果显示, 反应初期麦芽糖淀粉酶催化淀粉主要产物为麦芽糖和葡萄糖, 随着反应的进行, 麦芽糖淀粉酶又催化葡萄糖和麦芽糖通过转糖基作用生成寡糖, 且随时间的增加反应产物也逐渐增多。

3 讨论

经序列分析, *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶基因amyM序列与已报道的*B. licheniformis* ATCC27811^[15]麦芽糖淀粉酶BLMA基因序列存在一定差异, 碱基序列同源性为98%, 有35个碱基序列不同, 氨基酸序列同源性为99%, 共11个氨基酸残基不同。 *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶在酶学性质方面也具有一定优势, Liu^[5]等报道的深海嗜热芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶只在pH 6.0~8.0范围内稳定, 而地衣芽孢杆菌ATCC14580来源的麦芽糖淀粉酶能在更宽泛的pH范围内(pH 4.5~8.5)稳定存在。

在已知的数据中, 有超过20种酶的信息显示证明, 麦芽糖淀粉酶、环状麦芽糊精酶和新普鲁兰酶三者非常相似, 很难区分, 序列之间有40%~86%的一致性。与典型的 α -淀粉酶不同, 它们具有一个新型的含有约130个氨基酸残基的N-末端区域, 并且对环状麦芽糊精具有优先底物特异性。尽管这3种酶具有不同的编码基因, 但三者酶学性质方面的差别还未见报道^[17]。

基于麦芽糖淀粉酶具有极大的工业应用价值, 且国内鲜见相关的研究报道, 所以本文就地衣芽孢杆菌来源的麦芽糖淀粉酶做了基因克隆、表达与性质研究, 旨在为麦芽糖淀粉酶的应用提供数据与理论依据。通过基因克隆等技术, *B. licheniformis* ATCC14580麦芽糖淀粉酶基因在大肠杆菌中成功得到表达。酶学性质研究结果显示, 该酶具有良好的稳定性, 能在中低温环境下较长时间保持稳定, 也能稳定存在于比较宽的pH范围, 且酶活受金属离子影响不显著, 具有一定的工业应用价值与潜力。但是, 本研究得到的重组酶表达量相对较低, 与实际应用之间还存在一定差距, 所以本课题组将通过优化发酵条件以及采用更高效的表达系统来实现酶的高表达。

References

- Kim DY, Cha CH, Oh WS, Yoon YJ, Kim JW. Expression of the promoter for the maltogenic amylase gene in *Bacillus subtilis* 168. *J Microbiol*, 2004, **42**: 319~327
- Park KH, Kim MJ, Lee HS, Han NS, Kim DM, Robyt J-F. Transglycosylation reactions of *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase with acarbose and various acceptors. *Carbohydr Res*, 1998, **313**: 235~246
- Kim YK, Kim MJ, Park CS, Park KH. Modification of sorbitol by transglycosylation using *Bacillus stearothermophilus* maltogenic amylase. *Food Sci Biotechnol*, 2002, **11**: 401~406
- Park KH, Kim TJ, Cheong TK, Kim JW, Oh BH, Svensson B. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the α -amylase family. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1478**: 165~185
- Liu Bin, Wang YQ, Zhang XB. Characterization of a recombinant maltogenic amylase from deep sea thermophilic *Bacillus* sp. WPD616. *Enzyme Microbial Technol*, 2006, **39**: 805~810
- Lee HS, Auh JH, Yoon HG, Kim MJ, Park JH, Hong SS. Cooperative action of α -glucanotransferase and maltogenic amylase for an improved process of isomaltotooligosaccharide (IMO) production. *J Agric Food Chem*, 2002, **50**: 2812~2817
- Igarashi K, Ara K, Saeki K, Ozaki K, Ozaki S, Ito S. Nucleotide sequence of the gene that encodes a neopullulanase from an alkalophilic *Bacillus*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, **56**: 514~516
- Oguma T, Matsuyama A, Kikuchi M, Nakano E. Cloning and sequence analysis of the cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus sphaericus* and expression in *Escherichia coli* cells. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **39**: 197~203
- Jones A, Lamsa M, Frandsen T, Spendler T, Harris P, Sloma A, Xu F, Nielsen J B, Cherry J R. Directed evolution of a maltogenic α -amylase from *Bacillus* sp TS-25. *J Biol Chem*, 2008, **134**: 325~333
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual .2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Zhuge J (诸葛健), Wang ZX (王正祥). Technical Manual of Industrial Microorganism. Beijing, China (北京): China Light Industry Press (中国轻工业出版社), 1994
- Jacobi A, Huber WM, Hennecke J. Elimination of all charged residues in the vicinity of the active-site helix of the disulfide oxidoreductase DsbA. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 21692~216991
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem*, 1976, **72**: 248~254
- Hansen SA. The thin-layer chromatographic method for the identification of mono-, di-, and trisaccharides. *J Chromatogr*, 1975, **107**: 224~226
- Kim IC, Cha JH, Kim JR, Jang SY, Seo BC, Cheong TK, Lee DS, Choi YD, Park KH. Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 22108~22114
- Lee HS, Kim MS, Cho HS, Kim JI, Kim TJ, Choi JH, Park C, Lee HS, Oh BH, Park KH. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 21891~21897