

中温 α -淀粉酶基因的克隆及在枯草芽孢杆菌中的高效表达

刘逸寒, 路福平, 王建玲, 胡 博

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 利用高效表达载体 pWB980, 实现了 *Bacillus subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶基因 *amy* 在 *B. subtilis* DB403 中的高效表达, 活力达到 770 U/mL. 经多步纯化, 重组酶 AMY 的比活达到 35.8 U/mg, 纯化倍数为 1.7, 获得凝胶电泳条带单一的蛋白样品, 经 SDS-PAGE 检测, 重组酶 AMY 相对分子质量为 4.8×10^4 . 对酶学性质进行分析, 重组酶 AMY 的最适反应温度为 60 °C, 最适反应 pH 为 6.0.

关键词: 枯草芽孢杆菌; 中温 α -淀粉酶; 高效表达; 纯化; 酶学性质

中图分类号: Q814.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2011)04-0001-05

High-Level Expression of the Medium-Temperature Alpha Amylase in *Bacillus subtilis*

LIU Yi-han, LU Fu-ping, WANG Jian-ling, HU Bo

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The medium-temperature alpha amylase gene from *Bacillus subtilis* BF768 was cloned into vector pWB980 and high-level expressed in *B. subtilis* DB403. The activity of AMY in the supernatant of the culture medium reached a maximum of 770 U/mL. By multi-step purification, the specific activity of AMY was up to 35.8 U/mg with a 1.7-fold purification. The recombinant enzyme AMY had a molecular mass of 4.8×10^4 . The optimum pH and temperature of AMY was 6.0 and 60 °C.

Keywords: *Bacillus subtilis*; medium-temperature alpha amylase; high-level expression; purification; enzyme properties

中温 α -淀粉酶的最适作用温度和 pH 分别为 60 °C 和 6.0, 是工业中应用最普遍的酶种之一, 被广泛应用于淀粉糖、味精、啤酒、酒精以及纺织退浆等工业生产^[1]. 1965 年, 我国开始应用 *B. subtilis* BF7658 生产 α -淀粉酶, 发酵活力为 200 U/mL 左右^[2]. 我国于 20 世纪 90 年代后期引进了国外生产中温 α -淀粉酶的优良菌株 *B. amyloliquefaciens* 和工艺技术, 发酵活力平均在 400 U/mL 左右. 目前我国多数厂家仍采用 *B. subtilis* BF7658 及其变异株生产中温 α -淀粉酶, 产酶水平稳定在 550 U/mL 左右. 但与其他酶制剂品种相比较, 其发酵水平提高较慢, 限制了中温 α -淀粉酶在各行业中的应用.

目前, 枯草芽孢杆菌表达系统已成为继大肠杆菌

之后重要的原核表达系统. 枯草芽孢杆菌遗传背景清楚^[3], 蛋白分泌机制健全, 生长迅速, 培养简便, 不分泌内毒素, 具有较好的生物安全性, 是美国食品药品监督管理局 (FDA) 和中国农业部批准使用的安全菌株; 并且它可直接将表达产物分泌到培养基中, 产物便于提取和纯化, 是表达外源基因的良好受体菌. 但由于枯草芽孢杆菌自身可向胞外分泌高浓度的蛋白酶, 以致影响了表达产物的产量和稳定性.

本研究将获得的 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶基因, 利用表达载体 pWB980^[4]和宿主菌株 *B. subtilis* DB403^[5], 对中温 α -淀粉酶进行表达. 表达载体 pWB980 具有高拷贝数 (121 个/细胞) 且含有可高效表达外源基因的 P43 启动子以及可将外源蛋白分泌

收稿日期: 2011-03-23; 修回日期: 2011-05-27

基金项目: 天津市科技攻关重点培育项目 (06YFGPSH03500); 天津科技大学自然科学基金资助项目 (20090205)

作者简介: 刘逸寒 (1982—), 男, 天津人, 讲师, 博士, lyh@tust.edu.cn.

到细胞外的信号肽 *sacB* 基因;同时, *B. subtilis* DB403 为 3 个蛋白酶缺陷菌株,可减少胞外蛋白酶的分泌量,以期获得中温 α -淀粉酶的高效表达,为以淀粉为原料深加工工业的发展提供有力的支撑.

1 材料与方 法

1.1 菌株、质粒与培养基

B. subtilis BF7658 和 *B. subtilis* DB403,均为本实验室保存. 质粒 pWB980 由加拿大 Calgary 大学 Dr. Sui-Lam Wong 惠赠.

LB 培养基用于细菌培养,筛选培养基为含卡那霉素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB/琼脂培养基,酶活力初步检测培养基为含 1%淀粉的 LB/琼脂培养基,用作透明圈选择. 枯草芽孢杆菌转化培养基为 GMI、GMII 培养基^[6].

1.2 酶与试剂

基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、限制性内切酶、T4DNA 连接酶、高保真 TaqDNA 聚合酶, TaKaRa 公司;DNA 相对分子质量标准、蛋白相对分子质量标准、卡那霉素,上海英骏生物技术有限公司;引物合成及测序由 TaKaRa 公司完成.

1.3 重组菌株的构建

根据 NCBI 网站公布的 *B. subtilis* α -淀粉酶基因序列,经比对后设计引物,以 *B. subtilis* BF7658 总 DNA 为模板,PCR 扩增获得 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶基因 *amy*,上游引物 P1:5'-CCC AAGCTTTTGCGCTTACAGCACCGTCGATCAA-3' (下划线部分为 *Hind*III 酶切位点),下游引物 P2:5'-CGCGATCCTTGAAGAATGTGTTACACCT-3' (下划线部分为 *Bam*HI 酶切位点). 将 PCR 产物及提取的质粒 pWB980,分别用 *Hind*III 和 *Bam*HI 进行双酶切,酶切产物经纯化回收后,用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜,构建重组质粒 pWB-*amy*,参照文献 [7]转化 *B. subtilis* DB403,将含卡那霉素的酶活初步检测平板上的转化子逐一点接在含卡那霉素的 LB/琼脂平板上保存,碘液熏蒸检测平板,确定透明圈与菌落直径比值大的转化子后,在 LB/琼脂保存平板上挑取相应转化子,分别进行 PCR 和双酶切法鉴定并进行测序.

1.4 重组酶的表达

将获得的工程菌株 pWB-*amy*/DB403 和对照菌株 pWB980/DB403 分别接种于 5 mL 的含卡那霉素 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜,按 1%的接种量转

接于装有 50 mL 含卡那霉素 LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,SDS-PAGE (分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%)检测蛋白的表达情况,同时测定酶活力. 采用 Lowry 法测定蛋白含量^[8].

1.5 工程菌株 7 L 发酵罐放大培养

种子培养基:LB 培养基.

发酵培养基(g/L):玉米粉 55,豆饼粉 45,淀粉 2,硫酸铵 4,磷酸氢二钠 8,氯化铵 1.3,氯化钙 2.7, pH 自然.

7 L 发酵罐培养条件参照文献[9].

1.6 活力检测

中温 α -淀粉酶活性测定方法和其他溶液的配制参照 QB/T 1803—1993《工业酶制剂通用试验方法》. 酶活计算: $X = c \times n$. 式中: X 为样品的酶活力, U/mL (U/g); c 为测试酶的浓度, U/mL; n 为样品的稀释倍数.

1.7 重组酶的分离纯化

收集工程菌 pWB-*amy*/DB403 发酵上清液 100 mL,加硫酸铵至 70%,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,6 000 r/min 离心 20 min,蛋白沉淀用 10 mL 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 溶解. 得到的活性组分上样到用浓度为 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 平衡过的 DEAE-Sephadex Fast Flow (2.4 cm \times 30 cm) 离子交换层析柱,用同样的缓冲液先洗脱未吸附的蛋白,再用含 0~1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 线性梯度洗脱,收集活性组分. 将得到的活性组分上样到用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.0) 平衡过的 Sephadex G-75 (1.6 cm \times 80 cm) 凝胶层析柱,再用同样的缓冲液洗脱,收集活性组分. 每步收集到的活性组分进行活力检测,并采用 Lowry 法测定蛋白含量^[8].

1.8 重组酶学性质分析

1.8.1 温度对酶活力的影响

纯酶最适反应温度的测定:在不同温度 (30、40、50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$)、pH 6.0 条件下保温 5 min,测定重组酶纯酶液的酶活力,将最高酶活力定为 100%.

纯酶的热稳定性测定:将重组酶纯酶液置于不同温度 (40、60、80、100 $^{\circ}\text{C}$)、pH 6.0 条件下保温 1 h,每隔 10 min 取出,各自测定其残余酶活力,以未保温的酶液活力为 100%,绘制热稳定性曲线.

1.8.2 pH 对酶活力的影响

纯酶最适反应 pH 的测定:在不同 pH (4.0、4.5、

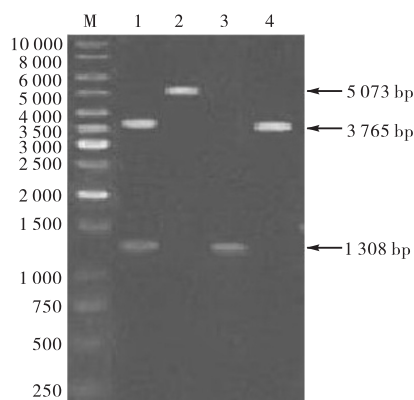
5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)、60 °C 条件下保温 5 min, 测定重组酶纯酶液的酶活力, 将最高酶活力定为 100%。

纯酶的 pH 稳定性测定: 将重组酶纯酶液在不同 pH(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5) 条件下 60 °C 保温 60 min, 各自测定其残余酶活力, 将最高残余酶活力定为 100%, 绘制 pH 稳定性曲线。

2 结果与分析

2.1 重组菌的筛选与鉴定

以提取的 *B. subtilis* BF7658 总 DNA 为模板, 利用 PCR 扩增出中温 α -淀粉酶基因片段(GenBank 的登录号为 FJ463162)。测序结果表明中温 α -淀粉酶的信号肽含有 41 个氨基酸, 成熟肽含有 436 个氨基酸。将中温 α -淀粉酶成熟肽基因片段 *amy* 经 *Hind*III-*Bam*HI 双酶切, 与 *Hind*III-*Bam*HI 线性化的质粒 pWB980 连接, 构建重组质粒 pWB-*amy*。将构建的重组质粒 pWB-*amy* 转化 *B. subtilis* DB403, 通过水解透明圈与菌落直径比筛选活力高的重组菌株, 在含有卡那霉素的 LB/琼脂平板上挑取该阳性转化子, 提取质粒分别用 *Hind*III 和 *Hind*III-*Bam*HI 进行单酶切和双酶切验证, 电泳检测结果(图 1)表明重组子质粒中已带有目的基因 *amy*, 获得重组菌株 pWB-*amy*/DB403。



M. 1 000 bp DNA ladder; 1. pWB-*amy*/*Hind*III + *Bam*HI; 2. pWB-*amy*/*Hind*III; 3. *amy* 基因; 4. pWB980/*Hind*III + *Bam*HI

图 1 pWB-*amy* 重组质粒酶切图

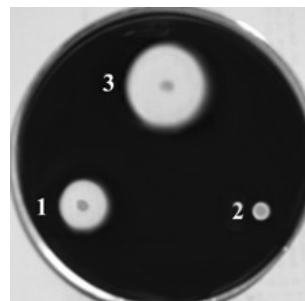
Fig.1 Verification of recombinant plasmids with single and double enzyme digestion

2.2 重组酶 AMY 的表达

将 pWB-*amy*/DB403、*B. subtilis* BF7658 和 pWB980/DB403 分别点接到含 1%淀粉的 LB/琼脂平板上, 如图 2 所示。pWB-*amy*/DB403 的水解透明圈与菌落直径的比值明显大于 *B. subtilis* BF7658 和

pWB980/DB403。

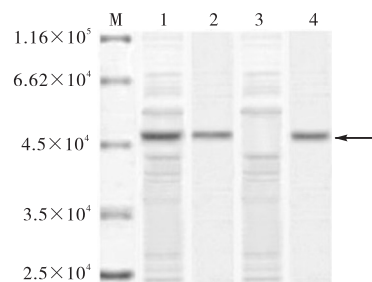
将 pWB-*amy*/DB403 和 pWB980/DB403 在 37 °C 分别培养 36 h, 收集上清液, SDS-PAGE 检测蛋白的表达情况(图 3), pWB-*amy*/DB403 的上清液中发现有相对分子质量为 4.8×10^4 的表达蛋白 AMY(泳道 1), 与经过纯化的 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶(泳道 4)的大小一致, 在 pWB980/DB403(泳道 3)上清液中未发现同样的表达产物。同时, 测定 pWB-*amy*/DB403 上清液中温 α -淀粉酶 AMY 的酶活力可达 530 U/mL, 而 *B. subtilis* BF7658 的中温 α -淀粉酶活力仅为 200 U/mL。按照方法 1.5 所述对 pWB-*amy*/DB403 进行 7 L 发酵罐放大培养, 中温 α -淀粉酶 AMY 的酶活力可达 770 U/mL。



1. *B. subtilis* BF7658; 2. pWB980/DB403; 3. pWB-*amy*/DB403

图 2 α -淀粉酶活性的平板检测

Fig.2 Plate assay for activities of alpha amylase



M. 蛋白相对分子质量标准; 1. pWB-*amy*/DB403 上清液; 2. 纯化后 AMY; 3. pWB980/DB403 上清液; 4. 纯化后 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶

图 3 表达产物的聚丙烯酰胺电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of proteins secreted by *B. subtilis* DB403

2.3 重组酶的分离纯化

收集 pWB-*amy*/DB403 发酵上清液 100 mL, 经硫酸铵盐析、DEAE-Sepharose Fast Flow (2.4 cm \times 30 cm) 离子交换层析、Sephadex G-75 (1.6 cm \times 80 cm) 凝胶层析, 进行纯化。通过对重组酶 AMY 整个提纯工艺各纯化步骤的总蛋白、总酶活、比活、纯度及回收率等指标的跟踪测定, 得到 100 mL 重组酶

发酵上清液的纯化表,见表 1. 重组酶 AMY 发酵上清液经分离纯化后,纯度提高了 1.7 倍,回收率为 74.3%. 重组酶 AMY 的粗酶液经纯化后,得到相对分

子质量为 4.8×10^4 的单一电泳条带(图 3,泳道 2),与经过纯化的 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶(图 3,泳道 4)的大小一致.

表 1 重组酶 AMY 纯化表

Tab.1 Summary of purification of recombinant AMY

步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活/(U·mg ⁻¹)	回收率/%	纯化倍数
上清液	3 615	77 000	21.3	100	1.0
盐析	3 053	69 900	22.9	90.7	1.1
离子交换层析	2 350	63 200	26.9	82.2	1.3
凝胶层析	1 598	57 200	35.8	74.3	1.7

2.4 重组酶的酶学性质分析

2.4.1 酶的热稳定性

重组酶 AMY 及 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶反应的最适温度均为 60 °C. 分别对 AMY 及 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶的热稳定性进行分析,结果表明在 40 ~ 80 °C 保温 60 min,残余酶活分别为初始活力的 90%、80%及 50%(图 4 和图 5);在 100 °C 保温 30 min,完全失活.

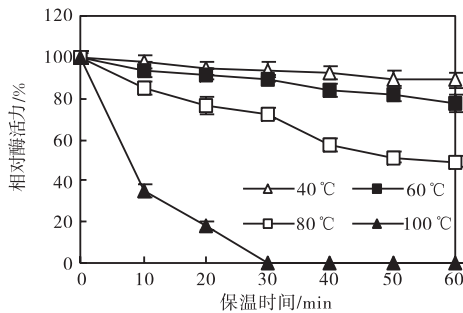


图 4 重组酶 AMY 的热稳定性曲线

Fig.4 Thermostability curve of recombinant AMY

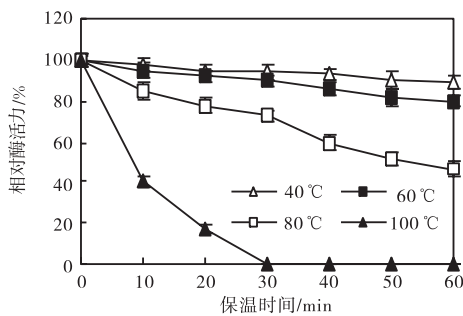


图 5 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶热稳定性曲线

Fig.5 Thermostability curve of the medium-temperature alpha amylase in *B. subtilis* BF7658

2.4.2 酶的 pH 稳定性

重组酶 AMY 及 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶的最适 pH 为 6.0. 分别对 AMY 及 *B. subtilis*

BF7658 中温 α -淀粉酶的 pH 稳定性进行分析(如图 6 所示),结果表明在 60 °C 保温 60 min, pH 在 5.5 ~ 7.5 范围内较稳定.

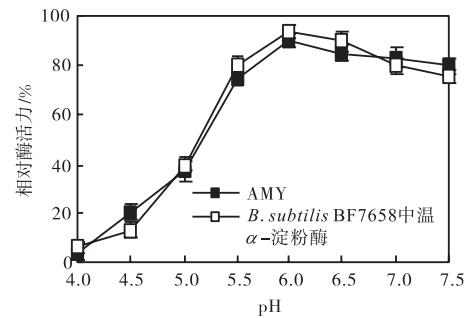


图 6 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶及 AMY 的 pH 稳定性曲线

Fig.6 Stability curve of pH of recombinant AMY and the medium temperature alpha amylase in *B. subtilis* BF7658

3 讨论

本项研究中,利用高效表达载体 pWB980,以 3 个蛋白酶缺陷的 *B. subtilis* DB403 作为宿主菌株,实现了 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶的高效表达,经发酵工艺优化后,活力可达到 770 U/mL,明显高于出发菌株 *B. subtilis* BF7658 的中温 α -淀粉酶活力 200 U/mL. 董晨等^[10]利用强启动子 P43 实现了地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶在 *B. subtilis* 1A752S 中的高水平表达,比原始菌株提高了 8.9 倍. 刘逸寒等^[11]利用质粒 pWB980 与 6 个蛋白酶缺陷的 *B. subtilis* WB600 实现了突变耐酸性高温 α -淀粉酶的高效表达,活力可达到 4 700 U/mL. 可见,由强启动子高拷贝载体质粒及本身胞外蛋白酶减少的枯草芽孢杆菌宿主菌株构建的表达体系可有效提高产酶量.

重组酶 AMY 经超滤、硫酸铵盐析、离子交换层析及凝胶层析纯化后,得到的 AMY 比活为 35.8 U/mg,纯化倍数为 1.7 倍,获得凝胶电泳条带单一的蛋白样品。在纯化过程中,操作相对简单且每步回收率较高,分析原因为外源蛋白表达量较高,同时由于宿主菌株 *B. subtilis* DB403 胞外蛋白分泌相对较少,稳定了外源蛋白并简化了纯化过程。

重组酶 AMY 与 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶最适温度均为 60 °C,在 40~80 °C 保温 60 min,残余酶活分别为初始活力的 90%、80%及 50%;在 100 °C 保温 30 min,完全失活。AMY 及 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶的最适 pH 为 6.0。分别对 AMY 及 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶的 pH 稳定性进行分析,结果表明在 60 °C 保温 60 min, pH 在 5.5~7.5 范围内较稳定。研究显示,中温 α -淀粉酶经过不同的宿主菌株表达后,催化性质并没有发生改变,保留原有的生物学活性。

外源基因的表达多采用大肠杆菌细胞内表达,提纯蛋白需要将细胞破碎或裂解,过程繁琐。而枯草芽孢杆菌具有将胞内蛋白分泌到细胞外的特点引起人们的普遍关注,利用枯草杆菌的分泌特点,构建高效表达体系表达外源蛋白,可简化生产工序,有效降低生产成本。在本研究基础上,下一步探索将 *B. subtilis* BF7658 中温 α -淀粉酶分别实现在分泌胞外蛋白酶更少的 *B. subtilis* WB600 中的游离及整合型表达,利用高拷贝质粒或将目的基因构建多个拷贝整合入宿主菌株基因组中,获得安全高效稳定的表达,为进一步工业化大规模生产应用在不同行业中的中温 α -淀粉酶奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] 李文德,路义,周明琨. 枯草杆菌 BF7658 α -淀粉酶在酿造工业上的应用[J]. 中国调味品,1995(10):17-19.
- [2] 刘仲敏,张新武,曹明照,等. 以玉米粉代替部分玉米淀粉生产中温 α -淀粉酶的研究[J]. 食品与发酵工业,2003,29(6):96-97.
- [3] Wong S L. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1995,6(5):517-522.
- [4] Wu S C, Wong S L. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biochemistry, 1999,72(1/2):185-195.
- [5] 蔡恒,陈忠军,李金霞,等. α -淀粉酶的耐酸性改造及在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 食品与发酵工业,2005,31(10):33-36.
- [6] Yasbin R E, Wilson G A, Young F E. Transformation and transfection in lysogenic strains of *Bacillus subtilis*: Evidence for selective induction of prophage[J]. Journal of Bacteriology, 1975,121(1):296-304.
- [7] Liu Y H, Lu F P, Li Y, et al. Characterisation of mutagenised acid-resistant alpha amylase expressed in *Bacillus subtilis* WB600[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008,78(1):85-94.
- [8] Lowry O H, Rosbrough N L, Farr A L. Protein measurement with folin phenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951,193(1):2265-2275.
- [9] 孙静,路福平,刘逸寒,等. 枯草芽孢杆菌工程菌产中温 α -淀粉酶发酵条件优化[J]. 中国酿造,2009,5:265-268.
- [10] 董晨,曹娟,张迹,等. 耐高温 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的高效表达[J]. 应用与环境生物学报,2008,14(4):2534-2538.
- [11] Liu Y H, Lu F P, Li Y, et al. Acid stabilization of *Bacillus licheniformis* alpha amylase through introduction of mutations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008,80(5):2795-2803.