

# Ca<sup>2+</sup>结合位点对极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 高温活性及热稳定性的影响

曾静, 郭建军, 顾斌涛, 张莉莉, 熊大维, 袁林

(江西省科学院, 微生物研究所, 江西南昌 330096)

**摘要:** 开发耐高温  $\alpha$ -淀粉酶是目前淀粉液化工艺的迫切需要, 极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶具有优良的高温活性和热稳定性, 其高温适应性机制研究可以为构建耐高温  $\alpha$ -淀粉酶提供理论依据和设计思路。通过分析来源于极端嗜热古生菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 的  $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 的氨基酸序列, 构建 Ca<sup>2+</sup>结合位点突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A。酶学性质分析表明, 与野生型 ApkAds 相比, 突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的高温活性和热稳定性明显降低。其中 ApkAds 的最适反应温度为 90 °C, 对应的绝对酶活为 2946.75 U/mg; 突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的最适反应温度为 80 °C, 对应的绝对酶活为 917.07 U/mg。ApkAds 于 90 °C 的半衰期约为 5 h, 突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 于 90 °C 的半衰期约为 2 h。本研究结果表明 ApkA 中 Ca<sup>2+</sup>结合位点与其高温活性和热稳定性均相关, Asn110、Asp155 及 Asp164 这三个氨基酸残基的丙氨酸替换突变不利于 ApkA 维持其高温活性和热稳定性。

**关键词:** 极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶; Ca<sup>2+</sup>结合位点; 定点突变; 高温活性; 热稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)8-90-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.014

## Effect of the Ca<sup>2+</sup>-binding Site on Thermal Activity and Stability of the *Thermococcus kodakarensis* Hyperthermophilic $\alpha$ -Amylase ApkA

ZENG Jing, GUO Jian-jun, GU Bin-tao, ZHANG Li-li, XIONG Da-wei, YUAN Lin

(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

**Abstract:** The development of a thermostable  $\alpha$ -amylase for use in starch liquefaction processes is urgently needed. Hyperthermophilic  $\alpha$ -amylase possesses good activity at high temperature and thermal stability, and the study of the mechanism underlying the thermal adaptation of hyperthermophilic  $\alpha$ -amylase could provide a theoretical basis and design concept for the construction of other thermally stable  $\alpha$ -amylases. Based on the amino acid sequence of the  $\alpha$ -amylase ApkA produced by the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis* KOD1, a Ca<sup>2+</sup>-binding site mutant termed ApkAdsN110A/D155A/D164A was constructed. Enzymatic assays suggested that compared to wild-type ApkA, the mutant exhibited significantly reduced thermal activity and stability. The optimal reaction temperature of ApkA was 90 °C and the corresponding specific activity was 2946.75 U/mg, while the mutant had an optimal reaction temperature of 80 °C with corresponding specific activity of 917.07 U/mg. The half-lives of ApkA and the mutant at 90 °C were 5 h and 2 h, respectively. The results suggest that the Ca<sup>2+</sup>-binding site plays an important role in the maintenance of thermal activity and stability of ApkA, and that Ala substitutions at Asn110, Asp155, and Asp164 lower the thermal activity and stability.

**Key words:** hyperthermophilic  $\alpha$ -amylase; Ca<sup>2+</sup>-binding site; site-directed mutagenesis; thermal activity; thermal stability

$\alpha$ -淀粉酶是最重要的工业酶制剂之一, 占全球工业用酶份额的 30%, 在食品、医药以及工业等多种领

收稿日期: 2015-08-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31501422); 江西省青年科学基金资助项目(20151BAB214001); 江西省科学院资助项目(2014-YB-08、2014-XTPH1-08)

作者简介: 曾静(1986-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 极端嗜热蛋白质的高温适应性机制研究

通讯作者: 袁林(1980-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 工业微生物的应用研究

域都有应用<sup>[1]</sup>。耐高温  $\alpha$ -淀粉酶常被应用于淀粉液化工艺, 将淀粉水解成低分子量的糊精, 以制造各种糖浆。目前淀粉液化工艺仍存在较多的不足, 例如 110 °C 液化条件下, 玉米、小麦等蛋白质含量较高的粗原料的液化效果不够理想<sup>[2]</sup>; 工业上广泛使用的耐高温  $\alpha$ -淀粉酶 BLA 的耐热性与淀粉液化工艺的要求仍存在一定的差距<sup>[3]</sup>。为了简化淀粉液化工艺流程, 提高粗原料的液化效果, 国内外学者主要是通过以下两种途径以求获得更适用于淀粉液化工艺的  $\alpha$ -淀粉酶: (1) 寻找新的热稳定性较好的  $\alpha$ -淀粉酶; (2) 对

现有的 $\alpha$ -淀粉酶进行有关提高酶分子热稳定性的分子改造。已报道的文献表明极端嗜热微生物来源的极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶具有较好的高温活性和热稳定性<sup>[4]</sup>,因此在淀粉液化工艺中具有巨大的应用潜力,有关该类 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定机制研究可以为现有 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性改造提供理论依据和设计思路。

由极端嗜热古生菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 所产生的胞外 $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 具有较好的高温活性和热稳定性<sup>[5]</sup>,其最适反应温度为 90 °C, 100 °C 下可保持 80% 的酶活性, 110 °C 下仍有 20% 的酶活性。ApkA 的最适反应 pH 为 5~6.5, 于 pH 4.5 保持 40% 的酶活性。该酶在未补加 Ca<sup>2+</sup> 的条件下于 90 °C 保温 1 h 后保持 90% 的剩余活性, 在 2 mM Ca<sup>2+</sup> 的条件下于 100 °C 保温 1 h 后保持 40% 的剩余活性。鉴于 ApkA 具有较好的高温活性和热稳定性, 故有关 ApkA 的热稳定机制研究有利于探讨蛋白质类生物大分子适应高温环境的分子机制, 也可为其他 $\alpha$ -淀粉酶的稳定性改造提供理论依据和设计思路。为了阐述 ApkA 维持热稳定性的可能分子机制, 本研究拟通过对 ApkA 以及其他已知三维结构的极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶进行氨基酸序列同源比对和结构分析, 选定可能与其高温活性和热稳定性相关的 Ca<sup>2+</sup> 结合位点, 采用定点突变技术构建突变体, 在大肠杆菌中进行表达, 并检测突变体的高温活性和热稳定性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL、大肠杆菌克隆载体 pUC57、大肠杆菌表达载体 pET28a 均由本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基

大肠杆菌的培养采用 LB 培养基, 筛选培养基采用含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基。

#### 1.1.3 试剂

KOD DNA 聚合酶及 KOD-Plus-neo DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司; DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、低分子量蛋白质 Marker 购自 Fermentase 公司; DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒 E.Z.N.A. 购自 Omega Bio-tek 公司; Chelating Sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow 购自 GE Healthcare 公司; Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; 其它化学试剂均为国产或进口分析纯。基因合成由上海博益生物科技有限公司完成, PCR 引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析

分子克隆技术和表达产物的 SDS-PAGE 分析参照文献<sup>[6]</sup>进行。

#### 1.2.2 重组质粒 pET28a-ApkAds 的构建及鉴定

$\alpha$ -淀粉酶 ApkA 基因 *ApkA* 由上海博益生物科技有限公司合成, 将基因 *ApkA* 连接至载体 pUC57 构建质粒 pUC57-*ApkA*。设计引物 *ApkAds-F*、*ApkAds-R* 扩增基因 *ApkA* 不含信号肽的结构基因 *ApkAds*。以质粒 pUC57-*ApkA* 为模板, 以 *ApkAds-F*、*ApkAds-R* 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为: 98 °C 5 min; 98 °C 20 sec, 60 °C 20 sec, 74 °C 2 min, 30 个循环; 74 °C, 10 min。扩增产物经 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切, 连接至载体 pET28a, 构建亚克隆 pET28a-*ApkAds*。采用 *Nco* I 和 *Eco* R I 双酶切质粒鉴定是否有外源基因的插入。

表 1 构建重组质粒所用引物

Table 1 Sequences of the primers used for the construction of recombinant plasmids

引物名称	序列
<i>ApkAds-F</i>	5'-CATGCCATGGCGCAAAGTATTCGAACTCGAAG-3'
<i>ApkAds-R</i>	5'-CCGGAATTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGTCC-3'
N110A-F	5'-GCTGATATCGTCATAGCCACCGCGGGCGG-3'
N110A-R	5'-CCGCCCGCGGGTGGCTATGACGATATCAGC-3'
D155A-F	5'-GAGGTCAAGTGTGTGCGAGGGCACATTTGGAGG-3'
D155A-R	5'-CCTCAAATGTGCCCTCGCACAGCACTTGACCTC-3'
D164A-F	5'-CATTTGGAGGTTTCCAGCATAGCCCACGAGAAG-3'
D164A-R	5'-CTTCTCGTGGGCTATGCTGGGAAACCTCCAAATG-3'

注: 下划线标注的部分为限制性酶切割位点, 方框标注的部分为突变位点。

### 1.2.3 重组质粒 pET28a-ApkAdsN110A/D155A/D164A 的构建及鉴定

根据 QuikChange® 点突变试剂盒的原理, 结合  $\alpha$ -淀粉酶 *ApkA* 基因 *ApkA* 和拟突变的氨基酸位点设计引物 N110A-F、N110A-R、D155A-F、D155A-R、D164A-F、D164A-R。以 pET28a-*ApkAds* 为模板, 采用引物 N110A-F 和 N110A-R, 进行 PCR 扩增得到包含载体序列和基因序列的线性片段。PCR 扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 sec, 55 °C 20 sec, 68 °C 4 min, 35 个循环; 68 °C, 10 min。扩增产物经 *Dpn* I 酶处理后, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 卡那霉素抗性平板筛选转化子, 经测序鉴定是否为突变基因 *ApkAdsN110A*。在此基础上, 以 pET28a-*ApkAdsN110A* 为模板, 采用引物 D155A-F 和 D155A-R, 进行 PCR 扩增, 重复以上实验步骤, 获得重组质粒 pET28a-*ApkAdsN110A/D155A*。再以 pET28a-*ApkAdsN110A/D155A* 为模板, 采用引物 D164A-F 和 D164A-R, 进行 PCR 扩增, 重复以上实验步骤, 获得重组质粒 pET28a-*ApkAdsN110A/D155A/D164A*。

### 1.2.4 重组 $\alpha$ -淀粉酶的诱导表达和纯化

将 pET28a-*ApkAds* 和 pET28a-*ApkAdsN110A/D155A/D164A* 质粒分别转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus(D E3)-RIL。从新鲜的转化平板上挑取重组大肠杆菌单菌落, 分别接种于含有卡那霉素的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜。将过夜培养物以 1% 接种量转接至含有卡那霉素的 50 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养至菌液 OD<sub>600 nm</sub> 达到 0.5 左右。加入 IPTG 至其终浓度为 0.25 mM, 继续于 16 °C 培养 20 h, 12000 r/min 离心 5 min 收集菌体沉淀。

采用 50 mM MES, pH 6.5 缓冲液重悬并洗涤菌体沉淀, 再加入适量 50 mM MES, pH 6.5 缓冲液重悬菌体沉淀, 置于冰上用超声波破碎细胞。超声波细胞破碎仪的参数设置如下: 超声波功率为 25%, 超声波破碎时间为 3 s, 间歇 6 s。超声波处理菌体细胞至菌体悬液变为均一的溶液, 采用 SDS-PAGE 检测重组蛋白质的表达情况。

采用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱对细胞可溶成分中目的蛋白质进行纯化, 用 250 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱, 即得到纯化后的重组  $\alpha$ -淀粉酶 *ApkAds* 和 *ApkAdsN110A/D155A/D164A*。利用 SDS-PAGE 检测重组  $\alpha$ -淀粉酶的纯度, 并采用 Bradford 法测定重组  $\alpha$ -淀粉酶的浓度。

### 1.2.5 $\alpha$ -淀粉酶酶活力测定

将 10  $\mu$ L 酶液与 490  $\mu$ L 含 1% (m/V) 可溶性淀粉的 50 mM MES, pH 6.5 缓冲液混合, 于 90 °C 反应 30 min 后, 迅速放入冰水浴中终止反应, 然后采用 DNS 法

测定反应体系中还原糖量。酶活力单位(U)定义: 在一定反应条件下, 每分钟催化产生 1  $\mu$ mol 还原糖的酶量为一个酶活力单位(U)。

### 1.2.6 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质研究

按照上述反应体系混合酶液和底物, 分别于 40 °C~110 °C 反应 30 min, 测定不同温度下绝对酶活力, 并以绝对酶活对时间作图, 确定其最适反应温度。

将酶液分别于 90 °C、100 °C 保温, 分时间梯度取出部分样品, 根据如上反应体系测定酶活力。将未处理的酶液的酶活力定义为 100%, 并以相对酶活的百分比对时间作图, 评价酶的热稳定性。

### 1.2.7 氨基酸序列分析

通过 BLASTP 搜索比对, 找出与 *ApkA* 在氨基酸序列上高度相似的蛋白质。采用 ClustalW2 程序对这些蛋白质进行氨基酸序列比对。

### 1.2.8 数据统计分析

$\alpha$ -淀粉酶的酶学性质研究实验中, 每个实验做三个平行。运用软件 Sigma Plot 11.0 对试验数据进行统计分析并作图, 数据均以均值 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 定点突变位点的选择

根据采用 BLASTP 分析 *ApkA* 的氨基酸序列所得到的结果, *ApkA* 与来源于不同极端嗜热古生菌的  $\alpha$ -淀粉酶 PFA、TH\_amy1、TO\_amy1 分别具有 89%、86%、86% 的氨基酸序列相似性。以上四种  $\alpha$ -淀粉酶中, PFA 具有最强的热稳定性, 其最适反应温度高达 100 °C, 于 98 °C 的半衰期长达 13 h<sup>[7]</sup>。PFA 中位于酶分子的保守区域 I(region I)和保守区域 II(region II)之间的 Ca<sup>2+</sup>结合位点对于 PFA 维持高温活性和热稳定性非常重要<sup>[8,9]</sup>, 参与 Ca<sup>2+</sup>结合的氨基酸残基分别是 Asn110、Asp155、Gly157、Asp164 和 Gly202, 其中 Asn110、Asp155 和 Asp164 的侧链氧原子参与 Ca<sup>2+</sup>的结合, Gly157 和 Gly202 的主链氧原子参与 Ca<sup>2+</sup>的结合<sup>[8]</sup>; 在 *ApkA* 中, 这五个氨基酸残基所对应的氨基酸残基分别为 Asn110、Asp155、Gly157、Asp164 和 Gly202, 且 Tachibana 等发现额外补加的 Ca<sup>2+</sup>有利于提高 *ApkA* 的热稳定性<sup>[5]</sup>。因此 *ApkA* 含有可能的 Ca<sup>2+</sup>结合位点, Asn110、Asp155、Gly157、Asp164 和 Gly202 这五个氨基酸残基可能参与 *ApkA* 中 Ca<sup>2+</sup>的结合。本研究设计 Asn110、Asp155、Asp164 这三个氨基酸残基为突变位点, 构建三位点突变体 *ApkAdsN110A/D155A/D164A*, 探讨 *ApkA* 中可能的 Ca<sup>2+</sup>结合位点对 *ApkA*

的高温活性和热稳定性的影响。

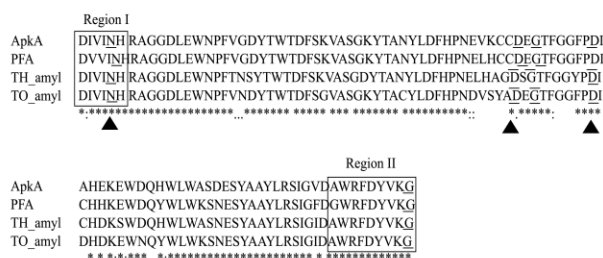


图1 ApkA与其他α-淀粉酶的氨基酸序列比对结果

Fig.1 Sequence alignment of ApkA and three other α-amylases

注：图中方框标示的 Region I 和 Region II 分别表示 α-淀粉酶的保守区域 I 和保守区域 II，下划线所标示的氨基酸残基为 PFA 的 Ca<sup>2+</sup>结合位点中与 Ca<sup>2+</sup>结合相关的氨基酸残基，实心三角形所标示的氨基酸残基为 ApkA 中待突变的氨基酸残基。

ApkA: 来源于 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 的 α-淀粉酶 (gi: 57641819); PFA: 来源于 *Pyrococcus furiosus* 的 α-淀粉酶 (gi: 499321102); TH\_amy1: 来源于 *Thermococcus hydrothermalis* 的 α-淀粉酶 (gi: 4049918); TO\_amy1: 来源于 *Thermococcus onnurineus* NA1 的 α-淀粉酶 (gi: 501568186)。

## 2.2 重组 α-淀粉酶的诱导表达与纯化

将重组质粒 pET28a-ApkAds 和 pET28a-ApkAdsN110A/D155A/D164A 分别转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, 获得重组大肠杆菌并进行诱导表达。经超声波破碎细胞后, 对重组 α-淀粉酶进行 SDS-PAGE 检测 (图 2)。如图 2 所示, 目的蛋白质 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的分子质量均约为 45 ku, 大小与理论值一致。采用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化位于重组大肠杆菌的细胞可溶成分中的目的蛋白质, 得到纯化后的重组 α-淀粉酶 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A。

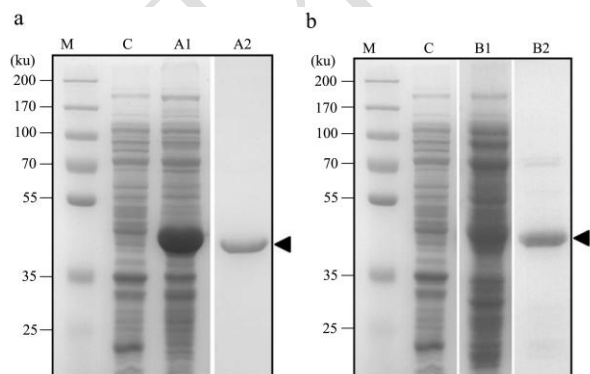


图2 重组 α-淀粉酶的 SDS-PAGE 检测图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant α-amylases

注：a 为重组蛋白质 ApkAds 的 SDS-PAGE 检测图。C 为含有质粒 pET28a 的重组大肠杆菌的全细胞样品, A1 为含有重

组质粒 pET28a-ApkAds 的重组大肠杆菌的全细胞样品, A2 为采用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析获得的 ApkAds 纯化样品。图中箭头所指为 ApkAds 的位置。B 为重组蛋白质 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的 SDS-PAGE 检测图。C 为含有质粒 pET28a 的重组大肠杆菌的全细胞样品, B1 为含有重组质粒 pET28a-ApkAdsN110A/D155A/D164A 的重组大肠杆菌的全细胞样品, B2 为采用 Ni<sup>2+</sup>亲和层析获得的 ApkAdsN110A/D155A/D164A 纯化样品。图中箭头所指为 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的位置。

## 2.3 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A

### 的酶学性质比较

#### 2.3.1 温度对重组 α-淀粉酶的酶活力的影响

以 1% 可溶性淀粉为底物, 于不同温度下测定重组 α-淀粉酶 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的绝对酶活, 结果如图 3 所示。ApkAds 的最适反应温度为 90 °C, 在此温度下的绝对酶活力为 2946.75 U/mg, 并且在 60 °C~100 °C 间 ApkAds 可保持 60% 以上的相对酶活力; 突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的最适反应温度为 80 °C, 在此温度下的绝对酶活力为 917.07 U/mg, 并且在 40 °C~110 °C 间其绝对酶活力均明显低于野生型 ApkAds 的绝对酶活力。即与 ApkAds 相比, 突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的最适反应温度和绝对酶活力均明显下降。

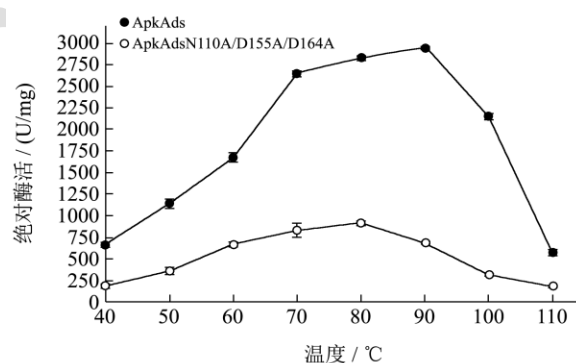


图3 温度对酶活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on α-amylase activity

#### 2.3.2 Ca<sup>2+</sup>对重组 α-淀粉酶的酶活力的影响

如表 2 所示, 额外补加的 Ca<sup>2+</sup>对以上两种重组 α-淀粉酶的酶活力无明显影响。此外, 与 ApkAds 相比, 金属离子螯合剂对 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的酶活力影响不显著。在金属离子螯合剂 (2 mM EDTA 或 2 mM EGTA) 存在的条件下, ApkAds 的酶活力为未处理样品的 40% 左右, 而突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的酶活力基本保持不变。另外, ApkAds 经 2 mM EDTA 处理后, 再补加 5 mM Ca<sup>2+</sup>进行酶活

力测定,发现其相对酶活力可回复为 96.81%。以上结果表明,重组  $\alpha$ -淀粉酶 ApkAds 结合了  $\text{Ca}^{2+}$ ,并且  $\text{Ca}^{2+}$  对于其维持高温活性非常重要。

表 2 不同试剂对酶活力的影响

**Table 2 Effects of different reagents on  $\alpha$ -amylase activity**

	相对酶活/%	
	ApkAds	ApkAds N110A/D155A/D164A
-	100	100
$\text{CaCl}_2$ (2 mM)	98.63±4.57	98.42±3.25
EDTA (2 mM)	42.92±3.52	96.42±4.24
EGTA (2 mM)	45.35±3.63	97.75±5.46
$\text{CaCl}_2$ (5 mM) <sup>a</sup>	96.81±5.64	nd

注:以 1%可溶性淀粉为底物,于 90 °C 反应 30 min 测定重组  $\alpha$ -淀粉酶的酶活力。反应体系中各试剂的终浓度为 2 mM,其中<sup>a</sup>为 ApkAds 经 2 mM EDTA 于 90 °C 处理 30 min,再补加  $\text{CaCl}_2$  至其终浓度为 5 mM 后所测得的相对酶活。nd 表示未检测。

### 2.3.3 重组 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性

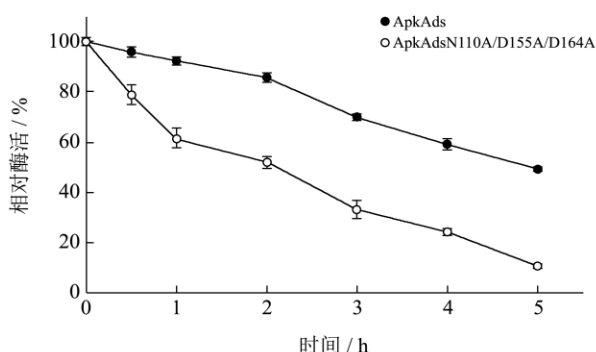


图 4 90 °C 重组  $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性

**Fig.4 Thermal stability of the wild-type and mutant  $\alpha$ -amylases incubated at 90 °C**

将重组  $\alpha$ -淀粉酶于 90 °C 或 100 °C 分别保温不同的时间,测定其相对酶活,比较重组  $\alpha$ -淀粉酶 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的热稳定性。如图 4 和图 5 所示,在 90 °C 和 100 °C 的条件下,野生型 ApkAds 的热稳定性均高于突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的热稳定性。其中 ApkAds 于 90 °C 的半衰期约为 5 h,ApkAdsN110A/D155A/D164A 于 90 °C 的半衰期约为 2 h。于 90 °C 保温 5 h 后,ApkAds 的相对酶活约为 49.24%,ApkAdsN110A/D155A/D164A 的相对酶活仅为 9.78%。此外,于 100 °C 保温 5 min 后,ApkAds 保持约 72.51% 的相对酶活,ApkAdsN110A/D155A/D164A 的相对酶活仅为 24.29%;保温 10 min 后,ApkAds 的相对酶活约为 29.03%,ApkAdsN110A/D155A/D164A 的相对酶活仅

为 7.34%。

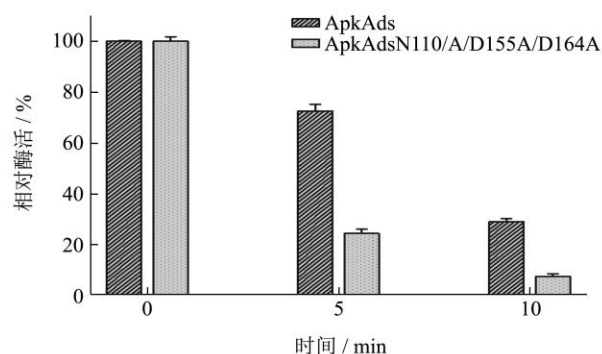


图 5 100 °C 重组  $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性

**Fig.5 Thermal stability of the wild-type and mutant  $\alpha$ -amylases incubated at 100 °C**

### 3 讨论

来源于极端嗜热微生物的极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶具有反应温度高、液化速度快、热稳定性好等特点<sup>[10]</sup>,在淀粉液化工艺中具有较好的应用前景。但是极端嗜热微生物的培养条件严格,并且产酶量低,直接从极端嗜热微生物中分离获得极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶的产率较低,从而造成极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶的不易大量获得,限制了它的应用<sup>[10]</sup>。其次,采用常温微生物作为极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶的表达宿主存在表达量低或催化活性下降等缺陷,因此在耐高温  $\alpha$ -淀粉酶的生产技术方面,现主要是采用基因工程技术对工业常用  $\alpha$ -淀粉酶进行有关提高酶分子热稳定性的分子改造,以获得适用于淀粉液化工艺的  $\alpha$ -淀粉酶。有关极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶高温适应性机制的研究,可以为其他  $\alpha$ -淀粉酶的分子改造提供理论依据和设计思路。

极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶的高温适应性机制符合极端嗜热蛋白质高温适应性机制的一般规律,包括增强非共价作用力、提高二级结构的稳定性、减少溶剂可及的疏水表面、提高酶分子结构的紧凑性、结合金属离子等因素<sup>[10]</sup>。例如,Linden 等通过对比极端嗜热  $\alpha$ -淀粉酶 PFA 与其他低温、中温微生物来源的  $\alpha$ -淀粉酶的分子结构发现,PFA 分子结构的紧凑性、离子键、 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$  双金属离子结合位点对于其维持热稳定性非常重要<sup>[11]</sup>。Machius 等和 Qin 等的研究表明位于  $\alpha$ -淀粉酶 BLA 的结构域 A 与结构域 B 之间的  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  三金属离子结合位点、结构域 A 与结构域 C 之间的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点对于 BLA 维持热稳定性非常重要<sup>[12,13]</sup>。大多数  $\alpha$ -淀粉酶属于糖苷水解酶类的第 13 家族,具有第 13 家族酶分子结构上的共同特征<sup>[14]</sup>,这有利于参照其他  $\alpha$ -淀粉酶的结构特征对某些  $\alpha$ -淀粉酶的特性进行定向分子改造。已有研究表明,根

据极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶分子结构中有利于其热稳定性的金属离子结合位点的结构特征,向其他 $\alpha$ -淀粉酶的分子结构中引入这些金属离子结合位点,有利于提高这些 $\alpha$ -淀粉酶的热稳定性。例如, Lim 等通过向来源于极端嗜热微生物 *Thermococcus onnurineus* NA1 的 $\alpha$ -淀粉酶中引入  $Zn^{2+}$  结合位点,获得了 80 °C 热稳定性提高约 4.5 倍的突变体<sup>[15]</sup>。

本研究采用定点突变技术构建了极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 的  $Ca^{2+}$  结合位点突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A, 并通过比较突变体与野生型的高温活性和热稳定性,证实极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 至少含有一个高亲和力的  $Ca^{2+}$  结合位点,并且该  $Ca^{2+}$  结合位点对于 ApkA 维持其高温活性和热稳定性非常重要。首先,在金属离子螯合剂(EGTA 或 EDTA)存在的条件下,ApkA 的酶活力明显下降,而 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的酶活力基本保持不变。其可能原因是,在未额外补加  $Ca^{2+}$  的条件下,ApkA 能够在低浓度  $Ca^{2+}$  的环境中(如大肠杆菌胞内)结合  $Ca^{2+}$ ,经金属离子螯合剂处理后,ApkA 所结合的  $Ca^{2+}$  被夺走,其酶活力明显降低;突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 不能结合  $Ca^{2+}$ ,金属离子螯合剂处理不影响其酶活力。以上结果说明 ApkA 中该  $Ca^{2+}$  结合位点属于高亲和力  $Ca^{2+}$  结合位点,并且对于其维持高温活性非常重要。此外,温度对 ApkA 与突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 酶活力的影响也能说明该  $Ca^{2+}$  结合位点有利于 ApkA 维持其高温活性。其次,与野生型 ApkA 相比,突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 于 90 °C 或 100 °C 的热稳定性明显降低,说明 ApkA 中该  $Ca^{2+}$  结合位点在其维持热稳定性方面发挥重要作用。据报道,极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶 PFA 也含有与其高温活性和热稳定性相关的高亲和力  $Ca^{2+}$  结合位点<sup>[8,9,11]</sup>,据此我们推测极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶含有高亲和力  $Ca^{2+}$  结合位点可能是这类酶适应极端高温环境所采取的一个共同策略,此研究结果可以为提高其他 $\alpha$ -淀粉酶的高温活性和热稳定性的分子改造提供理论依据和设计思路。

#### 4 结论

本研究对极端嗜热 $\alpha$ -淀粉酶 ApkA 中可能参与  $Ca^{2+}$  结合的氨基酸残基进行定点突变,构建 ApkA 的  $Ca^{2+}$  结合位点突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A,并在大肠杆菌中表达重组 $\alpha$ -淀粉酶 ApkAds 和 ApkAdsN110A/D155A/D164A。对重组 $\alpha$ -淀粉酶的高温活性和热稳定性进行研究发现,野生型 ApkAds 的最适反应温度为 90 °C,突变体 ApkAdsN110A/

D155A/D164A 的最适反应温度为 80 °C,并且在 40 °C~110 °C 间突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的绝对酶活均明显低于野生型 ApkAds 的绝对酶活;野生型 ApkAds 于 90 °C 和 100 °C 的热稳定性均高于突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 的热稳定性,其中野生型 ApkAds 于 90 °C 的半衰期约为 5 h,突变体 ApkAdsN110A/D155A/D164A 于 90 °C 的半衰期约为 2 h。结果表明,ApkA 中该  $Ca^{2+}$  结合位点与其高温活性和热稳定性相关,Asn110、Asp155 及 Asp164 这三个氨基酸残基的丙氨酸替换突变不利于 ApkA 维持其高温活性和热稳定性。

#### 参考文献

- [1] Rana N, Walia A, Gaur A.  $\alpha$ -amylases from microbial sources and its potential applications in various industries [J]. National Academy Science Letters, 2013, 36(1): 9-17
- [2] Dhital S, Warren F J, Butterworth P J, et al. Mechanisms of starch digestion by  $\alpha$ -amylase-structural basis for kinetic properties [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2015
- [3] Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Co-production of  $\alpha$ -amylase and  $\beta$ -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(1): 150-157
- [4] Gurung N, Ray S, Bose S, et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond [J]. Bio. Med. Research International, 2013, 2013
- [5] Tachibana Y, Leclere M M, Fujiwara S, et al. Cloning and expression of the  $\alpha$ -amylase gene from the *Hyperthermophilic archaeon* *Pyrococcus* sp. KOD1, and characterization of the enzyme [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(3): 224-232
- [6] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012
- [7] Jorgensen S, Vørgias C E, Antranikian G. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular  $\alpha$ -amylase from the *Hyperthermophilic archaeon* *Pyrococcus furiosus* in *escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(26): 16335-16342
- [8] Linden A, Mayans O, Meyer-Klaucke W, et al. Differential regulation of a *Hyperthermophilic*  $\alpha$ -amylase with a novel (Ca, Zn) two-metal center by zinc [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(11): 9875-9884
- [9] Savchenko A, Vieille C, Kang S, et al. *Pyrococcus furiosus*

- $\alpha$ -amylase is stabilized by calcium and zinc [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(19): 6193-6201
- [10] Hiteshi K, Gupta R. Thermal adaptation of  $\alpha$ -amylases: a review [J]. *Extremophiles*, 2014, 18(6): 937-944
- [11] Linden A, Wilmanns M. Adaptation of class-13  $\alpha$ -amylases to diverse living conditions [J]. *ChemBiochem*, 2004, 5(2): 231-239
- [12] Machius M, Declerck N, Huber R, et al. Activation of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase through a disorder-order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium-sodium-calcium metal triad [J]. *Structure*, 1998, 6(3): 281-292
- [13] Qin Y N, Fang Z, Pan F G, et al. Significance of Tyr302, His235 and Asp194 in the  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(5): 895-899
- [14] Prakash O, Jaiswal N.  $\alpha$ -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(8): 2401-2414
- [15] Lim J K, Lee H S, Kim Y J, et al. Critical factors to high thermostability of an  $\alpha$ -amylase from *Hyperthermophilic archaeon Thermococcus onnurineus* NA1 [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(8): 1242-1248