

重组普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达

王海, 叶燕锐, 刘欣, 王斌, 潘力

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 普鲁兰酶可特异性地水解支链淀粉得到直链淀粉, 因而在淀粉加工过程中具有重要的应用。本研究从 *Bacillus naganensis* ATCC 53909 基因组中克隆了普鲁兰酶基因 *pul*, 并克隆到大肠杆菌-枯草芽孢杆菌穿梭载体 pBE 中, 构建表达载体 pBE-*pul*。在此基础上, 将来源于枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌以及解淀粉芽孢杆菌中的 17 个高表达基因的启动子分别克隆到表达载体 pBE-*pul* 中, 并转化至 *Bacillus subtilis* ATCC6051 Δ 10, 成功构建了十七株含有不同启动子介导普鲁兰酶分泌表达的重组菌株。对重组菌株的分泌表达比较发现, 启动子 P43 和 *PspovG* 介导的普鲁兰酶活性明显优于其他启动子, 其中 *PspovG* 介导的普鲁兰酶活性更高。同时, 还使用了启动子 *PspovG* 介导 N 端的 108 个氨基酸缺失的 *pul324* 突变体进行分泌表达。通过对 17 种启动子的比较和两个普鲁兰酶基因的比较, 本研究构建的一株重组菌株的普鲁兰酶的表达更为高效, 其活性高达 389.85 U/mL, 后者显著高于现有的相关报道。

关键词: 普鲁兰酶; 启动子; 分泌表达; 枯草芽孢杆菌; 长野芽孢杆菌

文章编号: 1673-9078(2018)10-87-93

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.013

High-performance Expression of Recombinant Pullulanase in *Bacillus Subtilis*

WANG Hai, YE Yan-ru, LIU Xin, WANG Bin, PAN Li

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Pullulanase can specifically hydrolyze amylopectin to get amylose, which is important in Starch industry applications. In this study, the pullulanase gene *pul* was cloned from the *Bacillus naganensis* ATCC 53909 genome and inserted into the *E.coli-Bacillus subtilis* shuttle vector pBE to construct the expression vector pBE-*pul*. Based on these, seventeen strong promoters from *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* were respectively cloned into the expression vector pBE-*pul* and transformed into *Bacillus subtilis* ATCC6051 Δ 10. Finally, Seventeen recombinant strains containing different strong promoters were constructed, the secretory expression of pullulanase was achieved and the activity of pullulanase was measured. The results indicated that the activity of pullulanase mediated by promoter P43 and *PspovG* was significantly higher than that mediated by the other promoters and the activity of pullulanase mediated by promoter *PspovG* was higher than that mediated by the promoter P43. Meanwhile, the pullulanase gene mutant *pul324* which deleted N-terminal 108 amino acids was investigated, which was mediated by promoter *PspovG*. Through comparing seventeen promoters and two pullulanase genes, a recombinant strain that can efficiently overexpress pullulanase was constructed successfully. The highest pullulanase activity reached 389.85 U/mL, significantly higher than that reported in the literature.

Key words: pullulanase; promoter; secretory expression; *Bacillus subtilis*; *Bacillus naganensis*

普鲁兰酶 (Pullulanase, EC3.2.1.41) 是 α -淀粉酶家族 GH13 中的一种脱支酶, 最早由 Bender 和 Wallenfels 发现并命名^[1,2]。它能够以内切方式专一性地水解普鲁兰多糖、淀粉和糖原等多糖中的 α -1,6 糖

收稿日期: 2018-02-23

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A050503016; 2016A010105004); 广东省自然科学基金项目 (2017A030313097); 华南理工大学中央高校基本科研业务费资助项目 (2015ZP032); 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室开放课题资助

作者简介: 王海 (1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 微生物蛋白酶工程

通讯作者: 潘力 (1967-), 男, 教授, 研究方向: 发酵工程与酶工程

苷键并形成直链淀粉^[3]。在食品加工行业的大部分淀粉原料中, 支链淀粉占总淀粉质量约为 70%~95%^[4]。在支链淀粉中出现约每 20~25 个葡萄糖残基中存在一个 α -1,6 糖苷键, 所以支链淀粉中约含有 4%~5% 的 α -1,6-糖苷键^[5]。支链的存在阻碍淀粉的分解, 影响了淀粉的利用和产品的质量, 造成资源浪费。普鲁兰酶能专一性地切断支链淀粉中的 α -1,6-糖苷键, 其转化率可达 100%^[6], 因此普鲁兰酶在提高淀粉利用率、降低原料消耗及提高产品质量方面有着相当巨大的价值, 在淀粉加工业中有良好的市场前景。

自从 1966 年 Bender 和 Wallenfels 通过产气杆菌

(*Aeorbaetere aerogenes*) 发酵获得普鲁兰酶以来^[1,2], 各国的科研人员经过广泛深入研究, 获得了不同来源微生物的普鲁兰酶。迄今, 已报道的有来自 *Bacillus acidopullulyticus*^[7]、*Bacillus naganoensis*^[8,9]、*Anoxybacillus sp. SK3-4*^[10]、*Bacillus megaterium*^[11]、*Thermus thermophilus HB27*^[12] 以及 *Bacillus subtilis 168*^[13] 等微生物的普鲁兰酶基因, 这些普鲁兰酶基因被克隆、测序并在大肠杆菌^[7,9]、酵母^[14] 和枯草芽孢杆菌^[8] 中实现了异源表达。但是来源于这些微生物的普鲁兰酶大部分是没有商业价值的, 不具有很好的耐酸性和高温耐受性, 满足工业需要条件的仅有 *Bacillus acidopullulyticus* 和 *Bacillus naganoensis* 等极少数菌株, 而且目前普鲁兰酶的表达水平不高, 表达量较高的是 Wan Song 等^[8] 报道的普鲁兰酶活性(24.5 U/mL), 这远远不足以工业化生产。在食品加工工业中, 普鲁兰酶通常应用于糖化发酵中, 与糖化酶协同使用, 所以只有具有与糖化酶相似的作用温度和作用 pH 的普鲁兰酶, 才能最大程度地实现淀粉质原料的分解, 大大开拓其市场。由于长野芽孢杆菌 (*Bacillus*

naganoensis) 的普鲁兰酶具有很好的酸性 pH 和高温耐受性, 适宜于工业应用条件, 是目前所筛选到的最好的普鲁兰酶基因之一。近年来, 通过基因工程手段表达并提高普鲁兰酶产量已经成为普鲁兰酶基础研究和应用研究的主要发展方向。

本研究从长野芽孢杆菌基因组中克隆普鲁兰酶基因, 构建重组质粒 pBE-pul。同时从枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的转录组中选取高表达基因的启动子, 克隆到重组质粒中, 转化到枯草芽孢杆菌 *B.subtilis* ATCC6051Δ10 中进行分泌表达。进一步尝试删除普鲁兰酶 N-末端的 108 个氨基酸, 得到普鲁兰酶突变体基因 *pul324*, 实现其在枯草芽孢杆菌中的高效表达。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体

本研究使用的菌株和质粒如表 1 所示。

表 1 菌株和载体

Table 1 Strains and vectors

Strains and vectors	Main properties	Source
<i>E.coli</i> stellar	<i>E. coli</i> HST08	本实验室保存
<i>B.subtilis</i> ATCC6051Δ10	<i>Spoll</i> ACΔ、 <i>srj</i> CA、 <i>apr</i> EA、 <i>npr</i> BA、 <i>npr</i> EA、 <i>mpr</i> Δ、 <i>vpr</i> Δ、 <i>bpf</i> Δ、 <i>ep</i> rΔ、 <i>wpr</i> Δ	本实验室保存
pBE	<i>E. coli</i> / <i>B. subtilis</i> 穿梭载体, Amp+, SPamyQ, Kan+	本实验室保存
pBE101 (P43)	P43, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE102 (PamyL)	PamyL, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE103 (PglvA)	PglvA, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE104 (PsigW)	PsigW, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE105 (PspovG)	PspovG, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE106 (Phag)	Phag, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE107 (PywzA)	PywzA, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE108 (Pveg)	Pveg, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE109 (PfusA)	PfusA, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE110 (PgapA)	PgapA, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE111 (Ppgk)	Ppgk, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE112 (Ptsf)	Ptsf, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE113 (PaprE)	PaprE, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE114 (PamyE)	PamyE, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE115 (PnprB)	PnprB, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE116 (PnprE)	PnprE, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE117 (PyqfD)	PyqfD, SPamyQ, <i>pul</i>	本研究构建
pBE201 (P43-pul324)	P43, SPamyQ, <i>pul324</i>	本研究构建
pBE202 (PspovG-pul324)	PspovG, SPamyQ, <i>pul324</i>	本研究构建

1.1.2 试剂和仪器

PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (premix)、DNA Ladder Marker 和 T4 DNA 连接酶等购于宝生物工程(大连)有限公司; 限制性内切酶以及 Taq PCR Mix master 购于 Thermo Fisher Scientific; 质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒和 PCR 产物回收试剂盒均购于广州美基(欣研)生物科技公司; 普鲁兰酶标准品 Pullulanase microbial 和普鲁兰多糖均购于 sigma 公司; 红普鲁兰多糖购于上海甄准生物科技有限公司; 实验

中所用其他试剂均为国产或进口分析纯。梯度 PCR 仪 Veriti® 96-Well Thermal Cycler, 美国 Applied Biosystems 公司; 全自动凝胶成像仪 Gel Logic 212 PRO, 美国 Carestream Health 公司; 紫外可见分光光度计 NanoDrop1000, 美国 Thermo Fisher 公司; 电转化仪 Eporator, 德国 Eppendorf 公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN。

1.1.3 引物设计

本研究使用的引物如表 2 所示。

表 2 引物序列表

Table 2 List of primers

引物名称	引物序列 (5'-3')	碱基数
F-pul (<i>Xho</i> I)	CCCTCGAGGATGGGAACACCACAAACATCGT	31
R-pul-His (<i>Xba</i> I)	GCTCTAGACTAATGATGATGATGATGATGTTACCATCAGATGGGCTTACTTC	53
F-Pul324 (<i>Xho</i> I)	CCCTCGAGCCTGCTGTAAGTAACGCTT	27

注: 下划线部分为酶切位点。

1.1.4 培养基

LB 培养基 (W/V): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 121 °C 高压灭菌 20 min; SOC 培养基 (W/V): 2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 121 °C 高压灭菌 20 min, 加入 10 mM MgCl₂ 和 20 mM 葡萄糖溶液; LBS 培养基 (W/V): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 0.5 M D-Sorbitol, 121 °C 高压灭菌 20 min; 种子培养基 (W/V): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 2% Glucose, 115 °C 高压灭菌 20 min; 发酵培养基 (W/V): 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 2% Glucose, 2% Starch soluble, 115 °C 高压灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 普鲁兰酶重组质粒的构建

根据来源于 *Bacillus naganensis* ATCC 53909 的普鲁兰酶基因 *pul*, 设计引物 F-pul (*Xho*I)、R-pul-His (*Xba*I) 和 F-Pul324 (*Xho*I) (表 2), 以 *B. naganensis* ATCC 53909 基因组为模板扩增得到普鲁兰酶基因片段。用 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切 pBE 表达载体和普鲁兰酶基因 *pul*, 分别进行琼脂糖凝胶电泳及胶回收。使用 DNA Ligation Kit 的 T4 DNA Ligase 将普鲁兰酶基因片段连接到载体 pBE 上, 连接液转化至 *E.coli* stellar 感受态细胞中, 加入 SOC 培养基复苏 1 h 后将复苏液涂布在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上培养, 挑取转化子单菌落进行验证筛选, 即可得到含有普鲁兰酶重组质粒的大肠杆菌菌株。普鲁兰酶重组质粒经过测序验证。

以 *B. subtilis* 168 基因组为模板进行 PCR 扩增得到启动子 P43、PspovG、Phag、PywzA、Pveg、PaprE、PamyE、PfusA、PgapA、Ppgk、Ptsf、PnprB、PnprE、PyqfD 片段, 以 *Bacillus licheniformis* 基因组为模板进行 PCR 扩增得到启动子 PamyL 和 PglvA 片段, 以 *Bacillus amyloliquefaciens* 基因组为模板进行 PCR 扩增得到启动子 PsigW 片段, 然后再分别对启动子片段和普鲁兰酶重组质粒进行 *Eco*RI 和 *Spe*I 双酶切, 将酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳并胶回收。使用 DNA Ligation Kit 的 T4 DNA Ligase 将各个启动子片段分别连接到普鲁兰酶重组质粒上, 连接液转化至 *E.coli* stellar 感受态细胞中, 加入 SOC 培养基复苏 1 h 后将复苏液涂布在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上培养, 挑取转化子单菌落进行验证筛选, 即可得到含有各个启动子的普鲁兰酶表达质粒。以上构建的质粒均经过测序验证。

1.2.2 重组普鲁兰酶在 *Bacillus subtilis* ATCC6051Δ10 中的表达

将上述测序正确的重组表达质粒电转化于 *B. subtilis* ATCC6051Δ10 感受态细胞, 加入 890 μL 的 LBS 培养基复苏 5~6 h 后将复苏液涂布在含 20 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落转化子进行验证筛选, 即可得到普鲁兰酶重组表达菌株 pBE101 (P43), pBE102 (PamyL), pBE103 (PglvA), pBE104 (PsigW), pBE105 (PspovG), pBE106 (Phag), pBE107 (PywzA), pBE108 (Pveg), pBE109 (PfusA), pBE110 (PgapA), pBE111 (Ppgk), pBE112 (Ptsf), pBE113 (PaprE), pBE114 (PamyE), pBE115 (PnprB), pBE116 (PnprE), pBE117 (PyqfD)。

取 20 μL 活化的重组菌株接种于 1 mL 含 20 μg/mL 硫酸卡那霉素的种子培养基中,置于 37 °C 摇床以 200 r/min 的转速培养 24 h。然后将种子液以 1% 的接种量 (V/V) 转接至 2 mL 含 20 μg/mL 硫酸卡那霉素的发酵培养基中,每个菌株重复发酵三次。置于 37 °C 摇床以 200 r/min 的转速培养 48 h 后取样,在 4 °C 冷冻离心机中以转速 10000 r/min 离心 4 min 获取发酵上清液,发酵上清液用于进一步的实验研究。

1.2.3 重组普鲁兰酶的酶活性检测

根据降解 Red-Pullulan 的能力来确定普鲁兰酶的活性。普鲁兰酶酶活的测定参考 Jinho Kang^[15]的 DNS 方法和 Megazyme 公司 Red-Pullulan 使用说明书,并以诺维信公司市售普鲁兰酶作为标准品,测定方法如下:取适当稀释的标准普鲁兰酶酶液 100 μL,加入 300 μL 以 pH 4.75 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液配制的 1.0% 的 Red-Pullulane 为底物,充分混匀后置于 60 °C 水浴锅中孵育 30 min。立即加入 1 mL 无水乙醇,振荡混匀后静置 5 min,以 5000 r/min 的转速离心 5 min,在 M200 多功能酶标仪中以波长 510 nm 测定出反应液的吸光度值。普鲁兰酶酶活测定时,以 *Bacillus subtilis* ATCC6051Δ10 野生菌发酵上清液作为空白对照。每管样品重复检测三次。根据所检测 OD_{510 nm} 值和与酶活力之间的线性关系即可计算得到发酵液酶活。普鲁兰酶酶活单位定义:在相应条件下,每分钟分解普鲁兰所释放的还原糖,其还原力相当于 1 μmol 葡萄糖所需的酶量,以 1 U 表示。

1.2.4 普鲁兰酶突变体重组表达菌株的构建

在利用 PCR 方法缺失普鲁兰酶前面 108 个氨基酸得到普鲁兰酶突变体 *pul324*,克隆到上一步研究中筛选到的强启动子 *PspovG* 载体上,构建菌株 pBE202 (*PspovG-pul324*),进行分泌表达。

1.2.5 摇瓶发酵

选取野生菌 *B.subtilis* ATCC6051Δ10,普鲁兰酶重组高表达菌株 pBE105 (*PspovG*) 和 pBE202 (*PspovG-pul324*) 进行摇瓶发酵。分别接种 20 μL 保种菌液于 24 孔板中,每个孔加入 3 mL 含有 20 μg/mL 硫酸卡那霉素的种子培养基,置于 37 °C 摇床 200 r/min 培养至 24 h;检测各个菌株的生物量 OD_{600 nm},并以等生物量(约为 1% 的接种量)接种适量菌液至 50 mL 发酵培养基中发酵;每隔 12 h 取样 500 μL 检测其生物量和上清液酶活,直至 72 h。每个菌株重复发酵三瓶。

1.2.6 SDS-PAGE 分析

在 4 °C 低温离心机中离心收集发酵上清液,然后通过 0.45 μm 超滤膜抽滤获取发酵蛋白样品液。随后

利用 AKTA 蛋白纯化系统和 5 mL HisTrapTM FF crude 预装柱纯化处理后的蛋白样品液,结果表明在 20% Buffer B 条件下洗脱时出现目的蛋白峰,收集此时的洗脱液。然后,分别取 40 μL 发酵蛋白样品液和纯化洗脱液,向其中加入 10 μL 5×SDS-PAGE Loading Buffer,涡旋振荡混匀,沸水浴中加热处理 5 min 使蛋白变性。使用 5% 的浓缩胶,12% 的分离胶进行发酵液蛋白分离,然后在考马斯亮蓝 R-250 染液中染色,再经过脱色处理后显示蛋白条带。

1.2.7 数据统计分析

所有数据检测均重复三次或以上,结果以平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 普鲁兰酶重组质粒的构建

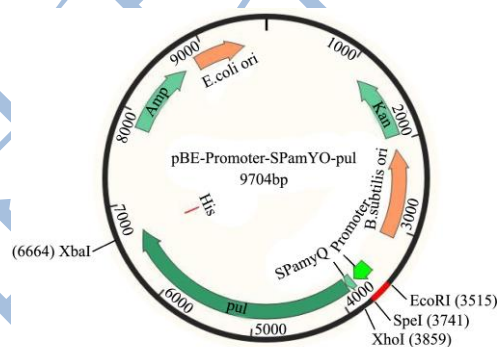


图1 *B. subtilis* ATCC6051Δ10 中含不同启动子的表达质粒的构建

Fig.1 Construction of expression plasmids for *B. subtilis* ATCC6051Δ10 with different promoters

注: Promoter 代表 P43、*PspovG*、*Phag*、*PywzA*、*Pveg*、*PaprE*、*PamyE* 等 17 种不同启动子。

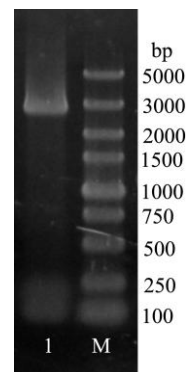


图2 普鲁兰酶基因 PCR 扩增电泳图

Fig.2 Electrophoresis image of pullulanase gene PCR

注: M, DL5000 bp DNA marker; 1, 普鲁兰酶基因 PCR 扩增产物。

从长野芽孢杆菌基因组中扩增出来的普鲁兰酶基

因片段电泳图如图 2 所示。通过 PCR 方法,成功扩增得到普鲁兰酶基因片段 *pul*, 大小为 2799 bp, 大小与预期的相一致(图 2)。再以限制性内切酶 *XhoI* 和 *XbaI* 对载体 pBE-SPamyQ 和片段 *pul* 分别进行双酶切, 连接后转化至大肠杆菌 *stellar* 感受细胞中。挑取单菌落鉴定后送至公司测序, 测序结果显示普鲁兰酶基因片段成功连接到表达载体上, 成功构建质粒 pBE-SPamyQ-Pul。

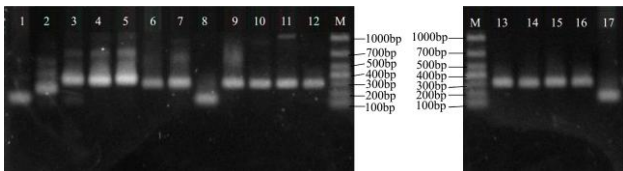


图 3 不同启动子的 PCR 扩增产物

Fig.3 PCR products of different promoters

注: M, DL1000bp DNA marker; 1, P43 的 PCR 产物; 2, *PamyL* 的 PCR 产物; 3, *PglvA* 的 PCR 产物; 4, *PsigW* 的 PCR 产物; 5, *PspovG* 的 PCR 产物; 6, *Phag* 的 PCR 产物; 7, *PywzA* 的 PCR 产物; 8, *Pveg* 的 PCR 产物; 9, *PfusA* 的 PCR 产物; 10, *PgapA* 的 PCR 产物; 11, *Ppgk* 的 PCR 产物; 12, *Ptsf* 的 PCR 产物; 13, *PaprE* 的 PCR 产物; 14, *PamyE* 的 PCR 产物; 15, *PnprB* 的 PCR 产物; 16, *PnprE* 的 PCR 产物; 17, *PyqfD* 的 PCR 产物。其中除了启动子 P43 为 148 bp, *PamyL* 为 214 bp, *PaprE* 为 154 bp 和 *Phag* 为 144 bp 之外, 其余启动子片段大小均为 300 bp。

分别从枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌基因组中扩增出来的启动子片段电泳图如图 3 所示。通过 PCR 方法, 成功扩增得到 17 种启动子片段, 大小与预期的相一致(图 3)。再以限制性内切酶 *EcoRI* 和 *SpeI* 对载体 pBE-SPamyQ-*pul* 和启动子片段分别进行双酶切, 连接后转化至大肠杆菌 *stellar* 感受细胞中。挑取单菌落鉴定后送至公司测序, 测序结果显示启动子片段成功连接到表达载体上, 成功构建质粒 pBE-Promoter-SPamyQ-*pul*。

2.2 不同启动子对普鲁兰酶重组菌株表达水平的影响

通过检测含不同启动子的普鲁兰酶重组表达菌株发酵液中的普鲁兰酶酶活发现, 不同的启动子介导的普鲁兰酶的表达水平差异较大, 其中启动子 P43 和 *PspovG* 介导的普鲁兰酶的表达水平远远高于其他启动子(图 4), 在 24 孔板中培养发酵 48 h 后普鲁兰酶酶活分别为 81.29 U/mL 和 86.67 U/mL, 含有启动子 *PspovG* 的重组普鲁兰酶表达菌株所显示的普鲁兰酶

酶活比含有传统强启动子 P43 的重组菌株更高。所以, 选用启动子 *PspovG* 进行下一步实验。

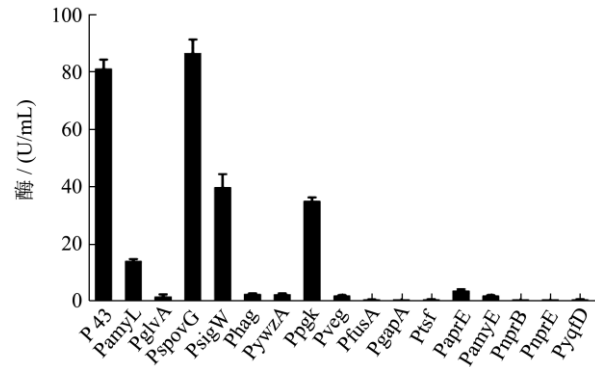


图 4 重组菌株的普鲁兰酶活性分析

Fig.4 Pullulanase activity analysis of recombinant strains

2.3 普鲁兰酶高表达菌株摇瓶发酵

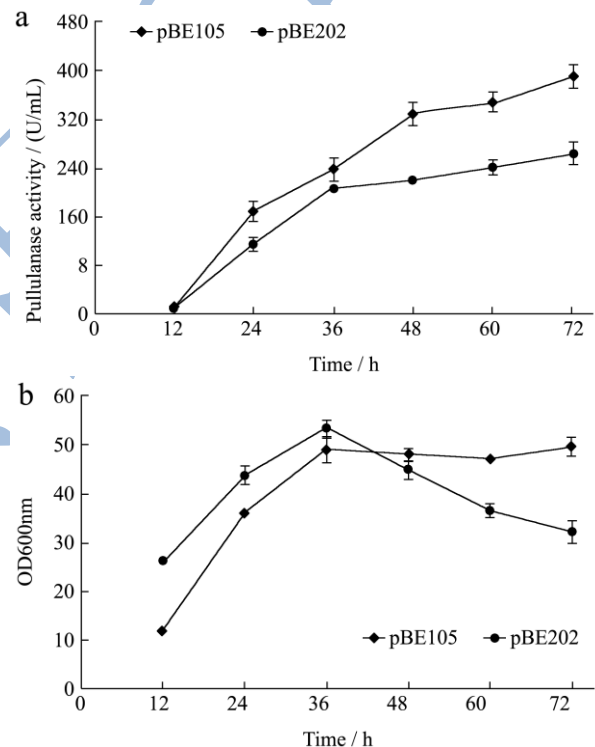


图 5 重组菌株表达产物的普鲁兰酶活性分析及菌株生长曲线

Fig.5 Pullulanase activity analysis and growth curve of recombinant strains

注: 标记 (◇) 和 (○) 分别代表重组菌株 *B.subtilis* ATCC6051Δ10/pBE105 (*PspovG*) 和 *B.subtilis* ATCC6051Δ10/pBE202 (*PspovG-pul324*)。a: 各重组菌株发酵上清液中普鲁兰酶酶活随时间的变化曲线; b: 各重组菌株的生长曲线。

对于上述筛选出来普鲁兰酶活性最高的启动子 *PspovG*, 成功构建质粒 pBE105 (*PspovG*) 和 pBE202 (*PspovG-pul324*)。对这两个质粒所在菌株进行发酵表达, 测定不同时间点的各菌株普鲁兰酶活性变化情

况(图5a)及菌株的生长情况(图5b)。普鲁兰酶酶活曲线表明,菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE105 (*PspovG*) 的发酵上清液中普鲁兰酶活性随着发酵时间的延长,酶活性持续升高,并在48 h达到相对稳定期,发酵72 h时酶活达到389.85 U/mL;而 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE202 (*PspovG-pul324*) 菌株发酵36 h达到相对稳定期,随着时间的增长,酶活力增长平缓,发酵72 h时酶活达到260.38 U/mL。同时重组菌株生长曲线表明,发酵菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE105 (*PspovG*) 和 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE202 (*PspovG-pul324*) 均在36 h时生物量达到最高值,随着时间的延长,菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE202 (*PspovG-pul324*) 生物量趋于平缓,而菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE105 (*PspovG*) 生物量迅速下降,说明不同是重组质粒对宿主菌的生长影响差异较大。由图5展示的两株普鲁兰酶重组菌株的产酶曲线和生长曲线,可以明显发现菌株 pBE105 (*PspovG*) 更适用于工业生产。首先,在相同的表达宿主菌中,由相同的启动子介导表达,菌株 pBE105 (*PspovG*) 发酵72 h后表达量比菌株 pBE202 (*PspovG-pul324*) 更高。其次,在菌体达到最高浓度时,菌株 pBE105 (*PspovG*) 的生长状态更佳,随着时间的延长,生物量可以保持相对稳定,这为持续表达普鲁兰酶提供了保障,这在工业化发酵中具有巨大优势。

2.4 发酵液 SDS-PAGE 分析

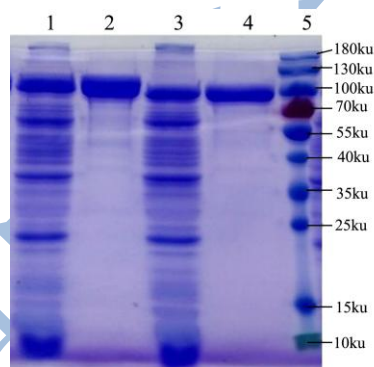


图6 重组菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of expression products of recombinant strains

注:泳道1为菌株 pBE105 (*PspovG*) 发酵上清液,泳道2为其蛋白纯化液;泳道3为菌株 pBE202 (*PspovG-pul324*) 发酵上清液,泳道4为其蛋白纯化液;泳道5为 PageRuler Prestained Protein Ladder #26616#。

SDS-PAGE 鉴定结果表明,重组菌株 pBE105 (*PspovG*) 的发酵上清液及其纯化液在100 ku附近有

一条表达条带,与普鲁兰酶理论大小一致,为普鲁兰酶蛋白,约为100 ku;而重组菌株 pBE202 (*PspovG-pul324*) 的发酵上清液及其纯化液在70~100 ku之间有一条表达条带,与普鲁兰酶突变体理论大小一致,为普鲁兰酶突变体,约为90 ku。其中,重组菌株 pBE105 (*PspovG*) 的普鲁兰酶表达量比 pBE202 (*PspovG-pul324*) 的更高,条带更粗,该结果与普鲁兰酶酶活性检测结果一致。同时发酵液经过纯化后,效果显著,说明重组菌株的普鲁兰酶表达为胞外分泌表达,纯化步骤简单快捷,效果好,非常适用于工业生产,为下游生产工艺提供了研究基础。

3 结论

本研究成功构建了17种含有不同启动子的普鲁兰酶重组质粒,并对其重组菌株的表达产物分别进行普鲁兰酶酶活性检测,其中重组菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE105 (*PspovG*) 的普鲁兰酶酶活性最高。接着,本研究又通过突变普鲁兰酶来进行一步摸索提高普鲁兰酶表达量的方法,成功构建了重组质粒 pBE202 (*PspovG-pul324*)。但是实验结果表明,在相同的载体和宿主菌中表达,普鲁兰酶突变体的表达量并没有普鲁兰酶原基因的表达量高,重组菌株 *B.subtilis* ATCC6051 Δ 10/pBE105 (*PspovG*) 发酵72 h后,最高普鲁兰酶酶活为389.85 U/mL。该酶活远远高于Wan Song等^[8]报道的普鲁兰酶活性(24.5 U/mL),实现了普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中的高水平表达。本研究成功实现了普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中的高效分泌表达,为普鲁兰酶基因工程改造奠定了一定的基础,同时推动普鲁兰酶的工业化生产。

参考文献

- [1] Kunamneni A, Singh S. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7 [J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1399-1404
 - [2] Saha B C, Zeikus J G. Novel highly thermostable pullulanase from *Thermophiles* [J]. *Trends in Biotechnology*, 1989, 7(9): 234-239
 - [3] Hii S L, Tan J S, Ling T C, et al. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications [J]. *Enzyme Research*, 2012, 2012(1): 921362
 - [4] 周瑞芳,彭凤翥.脱支酶的性质及在食品中的应用[J].河南工业大学学报(自然科学版),1993,4:26-32
- ZHOU Rui-fang, PENG Feng-nai. The properties of debranching enzyme and its application in food [J]. *Journal of*

- Henan University of Technology (Natural Science Edition), 1993, 4: 26-32
- [5] Jensen B F, Norman B E. *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase: application and regulatory aspects for use in the food industry [Promozyme] [J]. Process Biochemistry, 1984
- [6] Norman B E. A novel debranching enzyme for application in the glucose syrup industry [J]. Starch-Stärke, 1982, 34(10): 340-346
- [7] Chen A, Li Y, Liu X, et al. Soluble expression of pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus* in *Escherichia coli* by tightly controlling basal expression [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2014, 41(12): 1803-1810
- [8] Wan S, Yao N, Xiao Q M, et al. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis* : Effects of promoter and host [J]. Protein Expr Purif, 2016, 124: 23-31
- [9] Zhang Y, Liu Y H, Li Y, et al. Extracellular expression of pullulanase from *Bacillus naganoensis* in *Escherichia coli* [J]. Annals of Microbiology, 2013, 63(1): 289-294
- [10] Kahar U M, Ng C L, Chan K G, et al. Characterization of a type I pullulanase from *Anoxybacillus sp.* SK3-4 reveals an unusual substrate hydrolysis [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(14): 6291-6307
- [11] Yang S, Yan Q, Bao Q, et al. Expression and biochemical characterization of a novel type I pullulanase from *Bacillus megaterium* [J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(3): 397-405
- [12] Wu H, Yu X, Chen L, et al. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27 [J]. Protein Expr Purif, 2014, 95(5): 22-27
- [13] 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 Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006, 62(4): 381-384
- [14] Xu B, Yang Y J, Huang Z X. Cloning and overexpression of gene encoding the pullulanase from *Bacillus naganoensis* in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 16(8): 1185-1191
- [15] Kang J, Park K M, Choi K H, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana* [J]. Enzyme & Microbial Technology, 2011, 48(3): 260-266