

# *Paenibacillus puldeungensis* LK18 普鲁兰酶基因的克隆表达及酶学性质研究

苏红玉, 崔堂兵

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究根据类芽孢杆菌的普鲁兰酶基因的保守区设计兼并引物, 从 *Paenibacillus puldeungensis* LK18 中扩增出普鲁兰酶基因 (*pulA*), 将其连接至 pET-28a(+)载体上, 构建出重组表达载体 pET-28a(+)-*pulA*, 转入到 *Escherichia coli* BL21(DE3)中, 成功地表达了重组普鲁兰酶。结果表明: 该普鲁兰酶基因全长 1968 bp, 编码 655 个氨基酸。通过 Ni 柱亲和层析纯化出重组蛋白, 测定其比酶活为 508.8 U/mg, 分子量约为 76.95 ku。该重组酶的最适反应温度为 45 °C, 在 35 °C~40 °C 下保温 120 min 后剩余酶活达 60%以上; 最适作用 pH 为 6.0, 在 pH 6.0~8.0 条件具有较好的稳定性; 10 mmol/L 的 K<sup>+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>对该重组普鲁兰酶有激活作用, 而 Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>等对其有不同程度的抑制作用。本研究成功地构建出一株可高效表达普鲁兰酶的重组菌株, 具备一定的工业应用价值。

**关键词:** *Paenibacillus puldeungensis*; 普鲁兰酶; 克隆表达; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2019)07-107-113

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.7.015

## Gene Cloning, Expression and Characterization of a Pullulanase from *Paenibacillus puldeungensis* LK18 Strain

SU Hong-yu, CUI Tang-bing

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

**Abstract:** In this study, the pullulanase gene (*pulA*) was amplified from *Paenibacillus puldeungensis* LK18 strain based on the design and primer of its conserved region, and linked to the expression vector pET-28a (+). The recombinant plasmid pET-28a (+)-*pulA* was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) leading to the successful expression of the recombinant pullulanase. The results showed that the *pulA* gene had a full length of 1968bp encoded 655 amino acids. The recombinant pullulanase was purified by Ni affinity chromatography and had a specific activity of 508.8 U/mg and molecular weight of 76.95 ku. The optimal temperature of the recombinant enzyme was 45 °C and 60% of its enzyme activity was retained after an incubation at 35~40 °C for 120 min. This enzyme had an optimal pH of 6.0 and high stability at a pH in the range of 6.0~8.0. The enzyme was activated by K<sup>+</sup> and Mg<sup>2+</sup> at a concentration of 10 mmol/L, but inhibited by Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> to different extents. In this study, a recombinant strain with efficiently expressed pullulanase was constructed, which had a potential in industrial applications.

**Key words:** *Paenibacillus puldeungensis*; pullulanase; cloning and expression; enzymatic characterization

普鲁兰酶 (pullulanase, EC 3.2.1.41) 是一种淀粉脱支酶, 能够专一性地作用于普鲁兰糖、支链淀粉、极限糊精中的  $\alpha$ -1, 6 糖苷键, 切下整个侧枝, 形成直链淀粉<sup>[1]</sup>。淀粉加工业用到的原料中, 支链淀粉的含量约占 70%~95%<sup>[2]</sup>, 而支链淀粉中约含 4%~5%的  $\alpha$ -1, 6 糖苷键<sup>[3]</sup>,  $\alpha$ -1, 6 糖苷键的分解程度直接影响了淀粉的利用率及产品的质量。普鲁兰酶能将最小单位的支链分解, 充分利用原料, 这一特性决定了它在淀粉加

收稿日期: 2018-11-01

作者简介: 苏红玉 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 分子生物学

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

工业及医药化工等相关行业中的广泛应用<sup>[4]</sup>。

自 1966 年 Bender 和 Wallenfels 在产气气杆菌 *Aerobacter aerogene* 中首次发现普鲁兰酶以来<sup>[5]</sup>, 不断有各种来源的普鲁兰酶的相关报道, 已经发现的产普鲁兰酶的菌株主要集中在芽孢杆菌<sup>[6]</sup>、克雷伯氏菌<sup>[7]</sup>、多形拟杆菌<sup>[8]</sup>、链球菌<sup>[9]</sup>及热硫梭菌<sup>[10]</sup>等。相继有许多普鲁兰酶基因被克隆并在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母等宿主中表达<sup>[11-13]</sup>。然而普鲁兰酶的工业化生产菌很少, 仅有丹麦 Novo 公司的 *Bacillus acidopullulyticus*<sup>[14]</sup>和美国 Genencor 公司的 *Bacillus deramificans*<sup>[15]</sup>等应用到实际生产中, 国内大多数野生

菌株及基因工程菌的发酵水平均达不到工业需求<sup>[16]</sup>, 通过基因工程技术实现普鲁兰酶的高效表达仍是普鲁兰酶研究的主要方向。

本研究根据类芽孢杆菌来源的普鲁兰酶基因序列的保守区设计兼并引物, 从实验室自筛菌株 *Paenibacillus puldeungensis* LK18 中克隆出普鲁兰酶基因, 将该普鲁兰酶基因在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中进行异源表达, 同时在表达载体中引入 6×His-Tag 标签, 通过 Ni 柱亲和层析分离纯化出重组酶, 并研究其相关酶学性质。目前国内外尚且没有 *Paenibacillus puldeungensis* 来源的普鲁兰酶及其酶学性质的报道, 本研究为普鲁兰酶的酶库构建及工业化生产奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌株与质粒

*Paenibacillus puldeungensis* LK18, 实验室自筛野生菌; *Escherichia coli* BL21(DE3)感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司; JM110 感受态细胞, 上海唯

地生物技术有限公司; *pEASY-Blunt Cloning vector*, 北京全式金生物技术有限公司; *pET-28a(+)*, Invitrogen 生物公司。

#### 1.1.2 试剂与仪器

*TransStart KD Plus DNA Polymerase*、*2×EasyTaq PCR SuperMix 酶*, 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 (*Bam*HI 和 *Hind*III)、T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; DL5000 DNA Marker、DL 15000 DNA Marker、低分子量蛋白 Marker、6×Loading buffer, 宝生物工程(大连)有限公司; 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 天根生化科技有限公司; 普鲁兰糖, 美国 Sigma 公司 PCR 仪, Thermo Fisher Scientific; *DYY-6C* 型电泳仪, 北京六一仪器厂; 全自动凝胶成像仪, BIO-RAD 公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN; JY92-IIN 超声波细胞粉碎机, 美国 SONICS 公司; Eppendorf 5810R, 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; SK YB211C-JK 摇床, 广州科桥实验技术设备有限公司。

#### 1.1.3 引物设计

本研究所用的引物合成和测序工作均由广州艾基生物技术有限公司完成, 具体序列如表 1 所示。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'-3')
PF1	GCTTTCATYACKGCSTATTGCAAAGT
PR1	TAATTCCTTCGGATCDTASCCCCAGTT
PF2	TGGAACGAGGCCGCCGAYCCNTAYGC
PR2	AGGCCCATCAGGTGCAACCKRAANCCRTC
PF3	GACGTGTAYAACCAYGTNTATGACGG
PR3	TACCCYAGWATGAAKAGACCCGC
Pul-F ( <i>Bam</i> HI)	CGCGGATCCTTGTCTAGTACAGAAGGAAAGCAATG
Pul-R ( <i>Hind</i> III)	CCCAAGCTTCTACTCCGCGATGCTCAGCAC

### 1.2 普鲁兰酶部分基因的克隆

#### 1.2.1 普鲁兰酶部分基因的克隆

根据 NCBI 数据库公布的类芽孢杆菌来源的普鲁兰酶基因序列, 使用 ClustalX 软件对多条序列进行比对, 确定其保守区, 结合密码子偏好性, 设计三对兼并引物 (PF1、PR1; PF2、PR2; PF3、PR3), 以 *Paenibacillus puldeungensis* LK18 全基因组为模板, 通过 Touchdown PCR 扩增其普鲁兰酶部分基因, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 65 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 (延伸时间 1 kb/min), 每个循环退火温度降低 0.5 °C, 共 30 个循环; 然后 94 °C 变性 30 s; 50 °C 退火 30 s; 68 °C 延伸 (延伸时间 1 kb/min);

10 个循环; 最后 68 °C 保温 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的条带胶回收后送至公司测序。

#### 1.2.2 普鲁兰酶全基因的拼接及克隆

将普鲁兰酶部分基因的测序结果用 DNAMAN 进行比对和序列拼接, 并将拼接的序列提交至 NCBI 上的 ORF Finder 进行分析, 进一步获得 *pulA* 基因全长。根据 *pulA* 序列及 *pET-28a(+)* 载体的多克隆位点设计带有酶切位点的引物 (Pul-F、Pul-R), 使用高保真酶扩增出普鲁兰酶基因全长。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 59 °C 退火 30 s; 68 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 最后 68 °C 保温 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将目的条带胶回收后连接

*pEASY-Blunt* 平末端载体, 构建克隆质粒 *pEASY-Blunt-pulA*, 并转入 JM110 感受态细胞。经蓝白斑筛选挑取多个单菌落进行菌落 PCR 验证, 将验证正确的菌株扩大培养后送至公司测序。

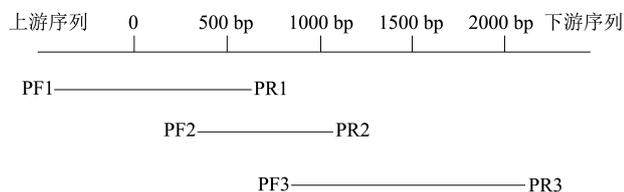


图1 普鲁兰酶基因序列拼接

Fig.1 Fragment assembly of pullulanase gene

### 1.2.3 重组质粒的构建

将测序正确的阳性克隆子扩大培养后提取质粒 *pEASY-Blunt-pulA*, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后胶回收, 用 T4 DNA 连接酶将其与 *pET-28a(+)* 双酶切后的胶回收产物于 16 °C 条件下过夜连接。将连接产物转化至 *E.coli* BL 21(DE3) 感受态细胞中, 涂布于含有 50 μg/mL 卡那霉素的平板上, 37 °C 过夜培养。挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 并扩大培养后提质粒, 进行质粒单双酶切验证。验证正确的菌株即为重组菌株 BL 21(DE3)-*pET-28a(+)-pulA*。

### 1.3 重组普鲁兰酶的诱导表达

将成功转入表达质粒的重组菌株 BL 21(DE3)-*pET-28a(+)-pulA* 接种到 20 mL 含有卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后, 以 1% 的接种量接种到 50 mL/250 mL LB 液体培养基 (含 50 μg/mL 卡那霉素) 中, 继续振荡培养至其 OD<sub>600</sub> 达到 0.6, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 于 22 °C、200 r/min 条件下培养 12 h 进行诱导表达。将诱导表达后的菌液于 4 °C、8000 r/min 下离心 10 min 收集菌体, 并用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 洗涤菌体 3 次后, 然后加入适量的缓冲液将其配成菌体浓度在 50 mg/mL~100 mg/mL 范围内的重悬液, 冰上超声破壁 20 min 后, 于 4 °C、12000 r/min 下离心 30 min 收集上清液, 即为粗酶液, 保存于 -80 °C。

### 1.4 重组酶的纯化及 SDS-PAGE 分析

使用 GE 公司的镍柱 HisTrap HP 对重组普鲁兰酶进行纯化, 操作步骤参考张瑶等<sup>[17]</sup>人的方法略作改动。首先使用 Buffer B 洗脱缓冲液 (50 mmol/L PBS 缓冲液, 0.5 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4) 冲洗 B 泵至基线平, 使用 Buffer A 结合缓冲液 (50 mmol/L PBS 缓冲液, 20 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl,

pH 7.4) 冲洗 A 泵至基线平, 然后将经 0.45 μm 滤膜过滤后的粗酶液进行上样, 当紫外吸收峰开始呈上升趋势, 同时离子浓度开始下降的时候, 收集穿透液。最后用 Buffer B 进行梯度洗脱, 收集各个梯度下观察到出峰时的洗脱液, 以牛血清蛋白 BSA 溶液制作标准曲线, 采用 Bradford 法<sup>[18]</sup>测定其蛋白含量的测定。取 40 μL 洗脱峰下收集的样品, 加入 10 μL 的 5×SDS-PAGE Loading Buffer, 振荡混匀后沸水加热处理 5 min 使蛋白变性, 以 5% 的浓缩胶, 10% 的分离胶进行蛋白电泳检测。

### 1.5 酶活力的测定

重组酶的酶活力测定参考陈文波等<sup>[19]</sup>人的 DNS 方法, 取 100 μL 适当稀释后的酶液加入到 100 μL 1% 普鲁兰糖溶液 (100 mmol/L PBS 缓冲液配置, pH 6.0) 中, 45 °C 恒温反应 30 min 后, 加入 300 μL DNS 试剂终止反应, 然后置于沸水浴中加热 5 min。取出冷却后用蒸馏水将其定容至 2.5 mL, 于 540 nm 处测定吸光值。以煮沸 10 min 灭活处理后的酶液作为对照。普鲁兰酶活力的定义为: 在相应条件下, 每分钟分解普鲁兰糖生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。

### 1.6 重组酶的酶学性质研究

#### 1.6.1 温度对酶活力的影响及温度稳定性

将适当稀释后的酶液与底物分别置于 25、30、35、40、45、50、55、60 °C 下反应 30 min, 测定重组普鲁兰酶的酶活力, 以酶活力最高者为 100% 对照, 以探究该重组普鲁兰酶的最适反应温度。将粗酶液分别置于 35、40、45、50 °C 条件下保温 15、30、45、60、75、90、105、120 min, 然后加入到底物中置于最适温度下反应 30 min, 测定其剩余酶活力, 以未保温处理的粗酶液的酶活作为 100% 对照, 探究该普鲁兰酶在不同温度下的稳定性。

#### 1.6.2 pH 对酶活力的影响及 pH 稳定性

在最适反应温度下, 将适当稀释后的酶液分别与 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 缓冲液配置而成的 1% 普鲁兰糖反应 30 min, 测定相应的酶活力, 以酶活力最高者为 100% 对照, 研究该酶的最适作用 pH。将粗酶液分别置于 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 缓冲液中室温保存 1 h 后, 于最适温度和 pH 下反应, 测定其剩余酶活力, 以未作处理的酶液的酶活力作为对照, 探究该重组普鲁兰酶在不同 pH 下的稳定性。

#### 1.6.3 金属离子对酶活力的影响

在底物中分别加入终浓度为 10 mmol/L 的  $K^+$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ，在最适温度和最佳 pH 下反应 30 min 后，测定其相应的酶活力，以未加入任何金属离子为对照，探究不同金属离子对该重组普鲁兰酶作用活性的影响。

### 1.7 数据处理

本实验中所有数据均为进行三次平行实验取其平均值所得。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *pulA* 基因的扩增与序列分析

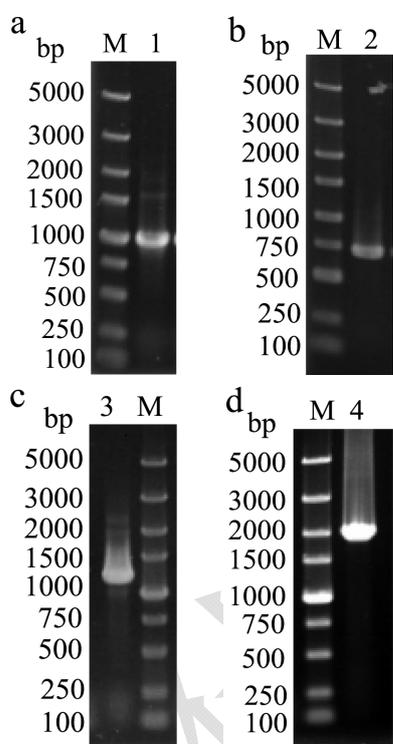


图2 普鲁兰酶部分基因及全长扩增

Fig.2 PCR amplification products of the fragment and full-length pullanase gene

注：a：引物 PF1 和 PR1 的扩增产物；b：引物 PF2 和 PR2 的扩增产物；c：引物 PF3 和 PR3 的扩增产物；d：引物 Pul-F 和 Pul-R 扩增的普鲁兰酶基因全长；M：DL 5000 DNA Marker。

通过兼并引物 PF1 和 PR1、PF2 和 PR2、PF3 和 PR3 分别扩增出长度为 996 bp (图 2a)、734 bp (图 2b)、1157 bp (图 2c) 的普鲁兰酶部分基因序列，用 DNAMAN 比对其重叠区域，进行序列拼接。将拼接的序列提交至 NCBI 上的 ORF Finder 进行分析，表明该基因有一个 1968 bp 的开放阅读框，将其命名为 *pulA*。以 *pulA* 序列为模板设计引物，成功扩增出了目的基因 (图 2d)。测序结果显示：该普鲁兰酶基因全

长 1968 bp，编码 655 个氨基酸。通过 Clustal Omega 在线软件 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 比对其氨基酸序列，发现其与 *Paenibacillus barengoltzii* CAU904 (GenBank 登录号：KP714732.1) 的序列同源率为 73%，与 *Paenibacillus durus* ATCC 35681 (GenBank 登录号：CP011114.1) 的序列同源率达 66%，与 *Paenibacillus graminis* DSM 15220 (GenBank 登录号：CP009287.1) 的相似性为 65%，说明类芽孢杆菌属的不同种之间，普鲁兰酶的序列差异较大。

### 2.2 重组质粒的构建

使用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切 *pEASY-Blunt-pulA* 与 pET-28a(+)质粒，分别胶回收其双酶切产物，16 °C 过夜连接，转入 *E.coli* BL21(DE3)后，将菌落 PCR 验证正确的阳性克隆子扩大培养提质粒，进行单双酶切验证，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测。结果如图 3 所示：菌落 PCR 大小显示为 1968 bp，与 *pulA* 基因大小相符；经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后的 pET-28a(+)-*pulA* 呈现的两个条带分别与 *pulA* 基因片段及 pET-28a(+)线性大小相符，说明重组质粒 pET-28a(+)-*pulA* 构建成功。

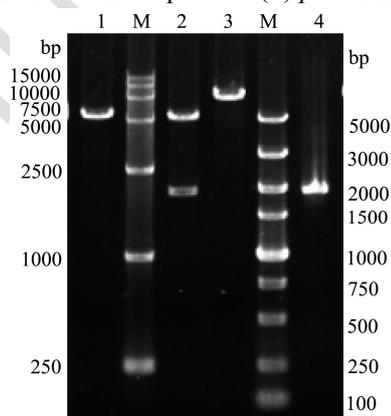


图3 单菌落验证及 pET-28a(+)-*pulA* 单双酶切电泳图

Fig.3 The electrophoretogram of single colony verification and the double digestion identification of plasmid pET-28a(+)-*pulA*

注：M 为 DNA Marker；泳道 1 为 pET-28a(+)双酶切产物；泳道 2 为重组质粒 pET-28a(+)-*pulA* 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切产物；泳道 3 为 pET-28a(+)-*pulA* 经 *Bam*HI 的单酶切产物；泳道 4 为阳性克隆子菌液 PCR 验证。

### 2.3 重组普鲁兰酶的诱导表达及分离纯化

将构建成功重组菌株 BL21(DE3)-pET-28a(+)-*pulA* 以终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 为诱导剂进行诱导表达，以空载菌株 BL21(DE3)-pET-28a(+)及未加入 IPTG 诱导的重组菌株作为对照，将诱导表达后的菌体超声破碎上清液通过 SDS-PAGE 进行检测。根据在线软件 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预

测该重组蛋白的分子量大小为 73.41 ku，加上目的基因 C 端的 6×His-Tag 等标签序列，预测诱导表达的蛋白的分子量大小约为 76.95 ku，等电点 pI 为 5.47。结果如图 4 所示：与对照菌株相比，重组菌株在 76.95 ku 处有明显条带，与目的蛋白推测分子量相符，说明 *pulA* 基因在 *E.coli* BL21(DE3) 中成功实现了异源表达。

将粗酶液进行 Ni 柱亲和层析，收集各个梯度下观察到出峰时的洗脱液，并进行 SDS-PAGE 检测及酶活力测定。如图 5 所示，与重组菌的菌体破碎上清液相比，经 Ni 柱亲和层析纯化后的蛋白条带较为单一。重

组普鲁兰酶的纯化结果见表 2，其比酶活为 508.8 U/mg，纯化了 2.36 倍，回收率达 41.89%。与已报道的相比，如 Wu 等人将来源于 *Thermus thermophilus* 的普鲁兰酶基因在大肠杆菌中进行异源表达，其比酶活为 280 U/mg<sup>[20]</sup>；Bertoldo 等人将来源于 *Anaerobranca gottschalkii* 的普鲁兰酶在大肠杆菌中表达，比酶活达 56 U/mg<sup>[21]</sup>；Liu 等人将 *Paenibacillus barengoltzii* 来源的普鲁兰酶基因在大肠中进行表达，重组酶的比酶活达 68.3 U/mg<sup>[22]</sup>，本研究所表达的重组普鲁兰酶的比酶活较高，具有一定的工业应用价值。

表 2 重组普鲁兰酶的纯化

Table 2 Purification of the recombinant pullulanase

样品	总蛋白/mg	总活力/U	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	57.7	12426.05	215.36	100	1
洗脱峰	10.23	5205.02	508.8	41.89	2.36

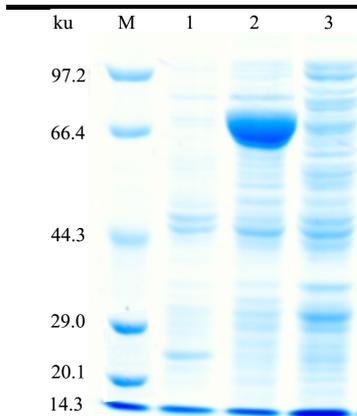


图 4 重组普鲁兰酶 SDS-PAGE 检测图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression of the recombinant pullulanase

pullulanase

注：M：蛋白 Marker；1：空载菌株破碎上清；2：诱导表达的重组菌株破碎上清；3：未诱导表达的重组菌株破碎上清。

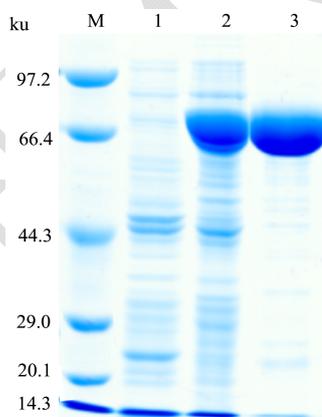


图 5 纯化后的普鲁兰酶 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant pullulanase

pullulanase

注：M：蛋白 Marker；1：空载菌株破碎壁上清；2：未纯化的重组普鲁兰酶；3：纯化后的重组普鲁兰酶。

## 2.4 重组酶的酶学性质研究

### 2.4.1 温度对酶活力的影响及温度稳定性

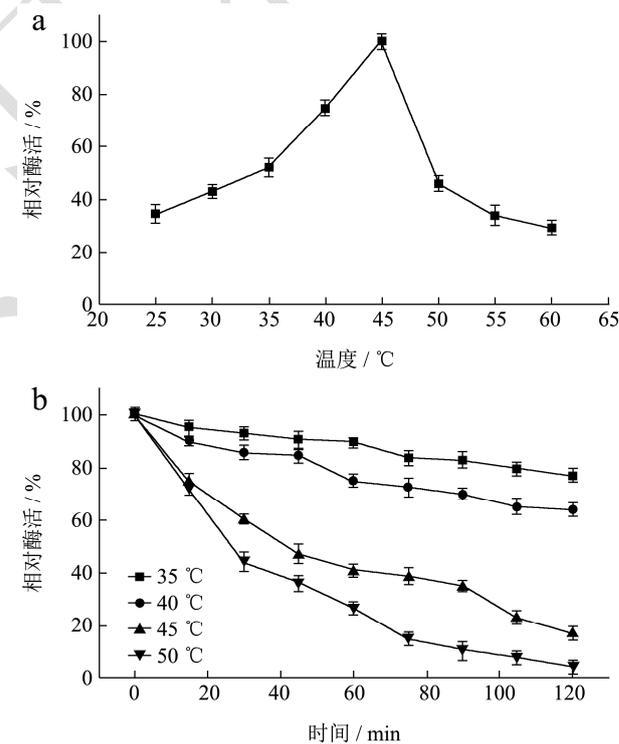


图 6 温度对酶活力的影响及其温度稳定性

Fig.6 Effect of temperature on the recombinant enzyme activity and its thermal stability

注：a：温度对重组普鲁兰酶酶活力的影响；b：重组普鲁兰酶的温度稳定性。

以纯化后的酶液为研究对象，测定重组酶的最适反应温度。结果如图 6a 所示，在以 1%普鲁兰糖 (pH 6.0) 为底物时，该重组普鲁兰酶的最适反应温度为 45 °C，在温度低于 35 °C 及高于 50 °C 条件下，重组

酶的作用活性较低。重组酶的温度稳定性实验结果如图 6b 所示, 该普鲁兰酶在 35 °C~40 °C 下较为稳定, 保温 120 min 后剩余酶活达 60% 以上; 当保温温度高于 45 °C 时, 重组酶活力在短时间内就急剧下降, 在 50 °C 下保温 30 min 后剩余酶活仅为 43.65%。

### 2.4.2 pH 对酶活力的影响及 pH 稳定性

如图 7a 所示, 重组普鲁兰酶的最适反应 pH 是 6.0, 在 pH 低于 5.0 及高于 8.0 条件下, 酶反应活性较低。目前已报道的细菌来源的普鲁兰酶的最适 pH 普遍介于 5.0~7.0 之间<sup>[23]</sup>。该重组酶的 pH 稳定性实验结果如图 7b 所示, 该酶在 pH 6.0~8.0 条件下保温 1 h, 酶活力仍剩余 60% 以上, 在 pH 9.0 条件下保温 1 h, 酶活力剩余 45.32%。本研究中的重组普鲁兰酶与其他报道中来源于类芽孢杆菌属的普鲁兰酶的最适 pH 较为接近, 如 Chen 等人报道出的来源于 *Paenibacillus lautus* 的普鲁兰酶的最适作用 pH 是 7.0, 在 pH 6.5~9.0 下保温 1 h 后, 相对酶活仍达 60% 以上<sup>[24]</sup>; 马静报道出的来源于 *Paenibacillus polymyxa* 的普鲁兰酶的最适 pH 为 6.0, 在 pH 5.5~8.0 范围内稳定性较好<sup>[25]</sup>。

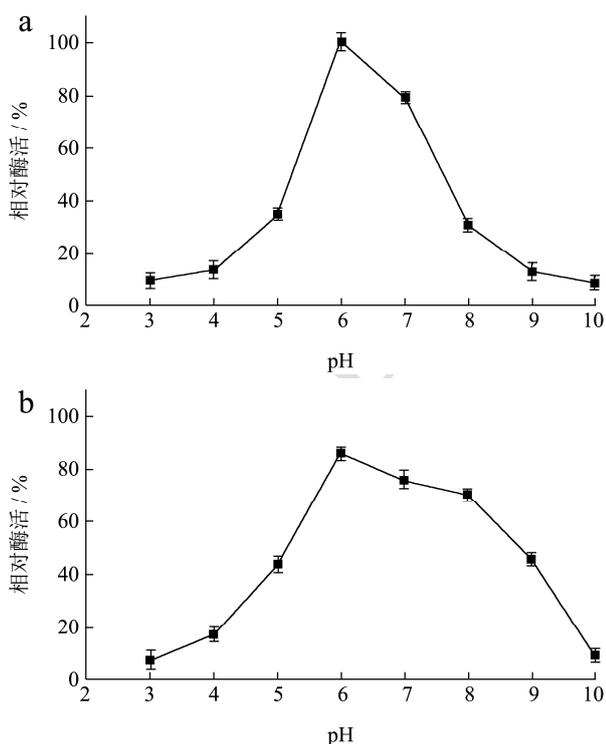


图 7 pH 对酶活力的影响和 pH 稳定性

Fig.7 Effect of pH on the recombinant enzyme activity and its pH stability

注: a: pH 对重组普鲁兰酶酶活力的影响; b: 重组普鲁兰酶的 pH 稳定性。

### 2.4.3 金属离子对酶活力的影响

向反应体系中加入终浓度为 10 mmol/L 的金属离子。实验结果如图 8 所示: 10 mmol/L 的  $K^+$  和  $Mg^{2+}$

对该重组酶有激活作用, 使其酶活力分别激活至 119.36% 和 123.68%; 10 mmol/L 的  $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  对重组酶有不同程度的抑制作用, 其中  $Cu^{2+}$  对该普鲁兰酶的抑制作用最强, 使其酶活力仅残留 16.73%。

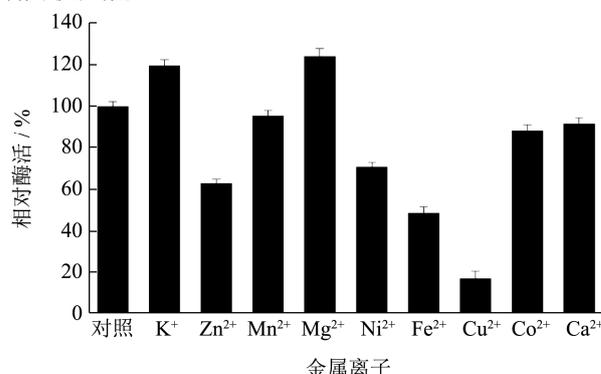


图 8 金属对酶活力的影响

Fig.8 Effect of metal ions on the recombinant enzyme activity

## 3 结论

3.1 本研究从 *Paenibacillus puldeungensis* LK18 中扩增出普鲁兰酶基因, 构建出重组质粒 pET-28a(+)-pula, 转入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中, 在 IPTG 诱导下实现了普鲁兰酶基因的高效异源表达。通过 Ni 柱亲和层析分离出纯度较高的目的蛋白, SDS-PAGE 检测显示: 重组蛋白的分子量约为 76.95 ku。该重组普鲁兰酶的最适反应温度为 45 °C, 在 35 °C~40 °C 下保温 120 min 后, 相对酶活达 60% 以上; 最适作用 pH 为 6.0, 在 pH 6.0~8.0 下保温 1 h, 酶活力仍剩余 60% 以上; 10 mmol/L 的  $K^+$  和  $Mg^{2+}$  对该重组酶有激活作用, 而  $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  等对其有不同程度的抑制作用。

3.2 本研究成功地构建出一株高效表达普鲁兰酶的重组菌株, 其比酶活可达 508.8 U/mg, 具备一定的工业生产价值。后期可通过蛋白质工程技术对该普鲁兰酶进行酶蛋白分子定向改良, 增加其耐热性, 使其更适用于实际生产, 以满足众多领域的需要。

## 参考文献

[1] Jespersen H M, Macgregor E A, Henrissat B, et al. Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: Prediction of structural features of the catalytic (beta/alpha) 8-barrel domain and evolutionary relationship to other amylolytic enzymes [J]. Journal of Protein Chemistry, 1993, 12(6): 791-805

[2] Møller M S, Henriksen A, Svensson B. Structure and function of  $\alpha$ -glucan debranching enzymes [J]. Cellular &

- Molecular Life Sciences, 2016, 73(14): 1-23
- [3] Bertoldo C, Antranikian G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6(2): 151-160
- [4] 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 Yu, DING Hong-biao, WANG Hai-yan, et al. Research advances in pullulanase [J]. Current Biotechnology, 2011, 1(3): 189-194
- [5] Wallenfels K, Bender H, Rached J R. Pullulanase from *Aerobacter aerogenes* production in a cell-bound state. Purification and properties of the enzyme [J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 1966, 22(3): 254-261
- [6] Nair S U, Singhal R S, Kamat M Y. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13 [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(4): 856-859
- [7] D'Enfert C, Chapon C, Pugsley A P. Export and secretion of the lipoprotein pullulanase by *Klebsiella pneumonia* [J]. Molecular Microbiology, 2010, 1(3): 107-116
- [8] Smith K A, Salyers A A. Cell-associated pullulanase from *Bacteroides thetaiotaomicron*: Cloning, characterization, and insertional mutagenesis to determine role in pullulan utilization [J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(4): 2116-2123
- [9] Bongaerts R J M, Heinz H P, Hadding U, et al. Antigenicity, expression, and molecular characterization of surface-located pullulanase of *Streptococcus pneumonia* [J]. Infection & Immunity, 2000, 68(12): 7141-7143
- [10] Mrudula. Optimization of thermostable amylopullulanase production in solid state fermentation by *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 through plackett-burman and response surface methodological approaches [J]. Malaysian Journal of Microbiology, 2010, 6(2): 181-195
- [11] Yan W, Nie Y, Xu Y. Expression and secretion regulation of *Bacillus naganoensis* pullulanase in recombinant *Escherichia coli* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(2): 145-153
- [12] Song W, Nie Y, Mu X Q, et al. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis*: Effects of promoter and host [J]. Protein Expression & Purification, 2016, 124: 23-31
- [13] 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
- [14] Jensen B F, Norman B E. *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase: Application and regulatory aspects for use in the food industry [J]. Process Biochemistry, 1984, 19(4): 129-134
- [15] Malviya S N, Malakar R, Tiwari A. Pullulanase: A potential enzyme for industrial application [J]. International Journal of Materials Research, 2010, 1(2): 10-20
- [16] 吕金芝,田健,伍宁丰,等.普鲁兰酶基因工程研究进展[J].中国农业科技导报,2015,17(4):85-91  
LYU Jin-zhi, TIAN Jian, WU Ning-feng, et al. Progress on pullulanase gene engineering [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2015, 17(4): 85-91
- [17] 张瑶.蜡状芽孢杆菌 CZ 磷酸甘露糖异构酶基因(pmi)的克隆表达及酶学性质研究[D].广州:华南理工大学,2017  
ZHANG Yao. Gene cloning and expression of a phosphomannose isomerase from *Bacillus cereus* CZ and characterization of the recombinant enzyme [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254
- [19] 陈文波.普鲁兰酶的产生菌筛选及其表达与分泌调控[D].无锡:江南大学,2013  
CHEN Wen-bo. Screening on producing strains, expression and secretion regulation on pullulanase [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [20] Wu H, Yu X, Chen L, et al. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27 [J]. Protein Expression & Purification, 2014, 95(5): 22-27
- [21] Bertoldo C, Armbrrecht M, Becker F, et al. Cloning, sequencing, and characterization of a heat- and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii* [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(6): 3407-3416
- [22] Liu J, Liu Y, Yan F, et al. Gene cloning, functional expression and characterisation of a novel type I pullulanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in resistant starch production [J]. Protein Expression & Purification, 2016, 121(3): 22-30
- [23] Monika D P, Jacek B. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin [J]. Critical Reviews in Microbiology, 2008, 30(2): 107-121

(下转第 35 页)