

# 重组 $\beta$ -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及其在糖化反应中的应用

曾君瑞, 潘力, 王斌

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

**摘要:**  $\beta$ -淀粉酶 ( $\beta$ -amylase, AmyM) 是一种重要的工业用酶, 广泛应用于啤酒酿造、制糖等行业中。本研究利用 *Bacillus megatherium* DSM 319 来源的  $\beta$ -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10) 中分泌表达。首先, 构建不同单启动子和双启动子介导  $\beta$ -淀粉酶表达的重组菌株, 在摇瓶培养条件下, 由 P<sub>43</sub>-P<sub>43</sub> 介导的双启动子重组菌株在发酵培养 27 h 时, 分泌  $\beta$ -淀粉酶酶活力最高达 2950.76 U/mL; 随后研究碳代谢阻遏效应 (Carbon Catabolite Repression, CCR) 对重组  $\beta$ -淀粉酶表达的影响, 发现对分解代谢控制蛋白 (Catabolite control protein A, CcpA) 在 DNA 上顺式调控元件的碱基位点进行定点突变, 可以有效缓解碳阻遏效应,  $\beta$ -淀粉酶酶活提高到 4663.03 U/mL; 最后, 将重组  $\beta$ -淀粉酶应用在糖化反应过程中, 结果表明麦芽糖转化率可以达到 57.62%。综上, 本研究成功构建出  $\beta$ -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达体系, 为工业化生产  $\beta$ -淀粉酶提供了理论数据支撑。

**关键词:**  $\beta$ -淀粉酶; 枯草芽孢杆菌; 启动子

文章编号: 1673-9078(2021)08-75-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.8.0954

## High-efficiency Expression of Recombinant $\beta$ -amylase in *Bacillus subtilis* and Its Application in Glycation

ZENG Jun-ru, PAN Li, WANG Bin

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:**  $\beta$ -amylase (AmyM) is an important industrial enzyme, which is mainly used in beer brewing and sugar industry. In this study, AmyM was first amplified from *Bacillus megatherium* DSM 319, and its expression in *B. subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 was analyzed. First, recombinant strains were successfully obtained using different single and dual promoters, and they were then cultured in shaking flasks. AmyM synthesized under the control of the P<sub>43</sub>-P<sub>43</sub> dual promoter showed the maximum enzymatic activity (approximately 2950.76 U/mL) after 27 h culture. Subsequently, the impact of carbon catabolite repression on the expression of recombinant AmyM was examined. Results showed that site-directed mutagenesis of bases at sites controlled by catabolite control protein A could effectively alleviate carbon repression, increasing the enzymatic activity of AmyM up to 4663.03 U/mL. Finally, recombinant AmyM was used for glycation, where a maximum maltose conversion rate of 57.62% was achieved. In summary, this study provided a high-efficiency expression scheme for AmyM in *B. subtilis* and supported the production of recombinant AmyM for industrial applications.

**Key words:**  $\beta$ -amylase; *Bacillus subtilis*; promoter

引文格式:

曾君瑞,潘力,王斌.重组  $\beta$ -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及其在糖化反应中的应用[J].现代食品科技,2021,37(8):75-83

ZENG Jun-ru, PAN Li, WANG Bin. High-efficiency expression of recombinant  $\beta$ -amylase in *Bacillus subtilis* and its application in glycation [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(8): 75-83

收稿日期: 2020-10-17

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020226007); 广州市科技计划项目 (202002030207)

作者简介: 曾君瑞 (1993-), 女, 硕士, 研究方向: 工业酶表达

通讯作者: 王斌 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 发酵工程与酶工程

$\beta$ -淀粉酶 ( $\alpha$ -1,4-D-glucan maltohydrolase, EC3.2.1.2), 是一种外切型淀粉酶<sup>[1]</sup>, 可以从糖原或淀粉的非还原性末端依次切割  $\alpha$ -1,4 糖苷键, 因此  $\beta$ -淀粉酶作用于直链淀粉时, 生成麦芽糖<sup>[2,3]</sup>, 而作用于支链淀粉时, 由于无法切割支链淀粉分支处的  $\alpha$ -1,6 糖苷键, 生成麦芽糖和极限糊精<sup>[4-6]</sup>。植物来源的  $\beta$ -淀粉

酶主要存在于胚乳中<sup>[7]</sup>,但制备工艺复杂,成本较高,原料受季节影响明显,且酶质量不稳定;微生物来源的 $\beta$ -淀粉酶主要是芽孢杆菌<sup>[8,9]</sup>,如弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*)<sup>[10]</sup>、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)<sup>[11]</sup>、多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)<sup>[12]</sup>、高温产硫化氢梭状芽孢杆菌(*Clostridium thermosulfurogenes*)<sup>[13]</sup>和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)<sup>[14]</sup>,随着发酵工艺逐渐成熟,易达到规模化生产,可以弥补植物来源的 $\beta$ -淀粉酶生产上不足,但现有报道表达水平整体不高,较高的是段绪果等<sup>[15]</sup>报道的 $\beta$ -淀粉酶酶活为925.40 U/mL,无法满足工业生产需要,所以利用基因工程等手段表达和提高 $\beta$ -淀粉酶酶活水平成为研究学者关注的方向。

在啤酒酿造、制糖等工业的糖化反应中, $\beta$ -淀粉酶需要保持与协同使用酶相似的作用温度和pH,以期最大程度提高麦芽糖转化率,现有研究发现*B.megaterium*来源的 $\beta$ -淀粉酶具有很好的温度耐受性和pH作用条件,满足糖化反应过程中偏酸性的要求,而其他来源的 $\beta$ -淀粉酶温度耐受性不好,作用pH为中性偏碱性,仅有*C.thermosulfurogenes*来源的 $\beta$ -淀粉酶最适温度为70℃,最适pH为6.0,因此*B.megaterium*是 $\beta$ -淀粉酶来源的理想菌株。微生物来源的 $\beta$ -淀粉酶在以枯草芽孢杆菌作为宿主表达时,酶活水平受调控元件-启动子和碳分解代谢物阻遏效应(Carbon Catabolite Repression, CCR)的影响。启动子是提高外源蛋白表达水平的关键<sup>[16,17]</sup>,因此可通过筛选强启动子以及串联单启动子,获得活性较高的启动子;CCR效应是指枯草芽孢杆菌在混合碳源环境发酵时,优先利用速效碳源,且其产物会抑制其他非速效碳源代谢相关基因的表达<sup>[18,19]</sup>。CCR效应中起关键作用的是分解代谢物控制蛋白(Catabolite control protein A, CcpA),该蛋白在DNA上的顺式调控元件称为分解代谢物响应元件(Catabolite Responsive Element, CRE),CRE是14 bp的回文序列且高度保守<sup>[20]</sup>。通过定点突变CRE位点保守碱基,可使细胞内阻遏复合物无法结合CRE位点,有效缓解CCR效应<sup>[21]</sup>,减弱对菌体生长和异源蛋白表达的抑制,从而提高 $\beta$ -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的表达水平。

本研究从*B.megaterium*基因组中扩增 $\beta$ -淀粉酶基因,同时分析枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、解链淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)转录组,选择扩增基因表达水平高的启动子,构建含有不同启动子的重组质粒,转化到宿主*B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10中分泌表达,然后通过基因编辑技术,定点突变CRE位点,提高

$\beta$ -淀粉酶的酶活水平,最后,将重组 $\beta$ -淀粉酶应用在糖化反应中,研究生成麦芽糖的转化率,为 $\beta$ -淀粉酶的高效表达提供强有力的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌*Escherichia coli stellar*, 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*, 地衣芽孢杆菌*Bacillus licheniformis*, 解链淀粉芽孢杆菌*Bacillus amyloliquefaciens*, 巨大芽孢杆菌*Bacillus megaterium* DSM 319, 枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 (SpoIIAC $\Delta$ 、srfCA $\Delta$ 、aprEA $\Delta$ 、nprB $\Delta$ 、nprE $\Delta$ 、mpr $\Delta$ 、vpr $\Delta$ 、bpf $\Delta$ 、epr $\Delta$ 、wprA $\Delta$ ), *E.coli*/*B.subtilis* pBE-穿梭载体, Amp<sup>+</sup>/Kan<sup>+</sup>, 均为本实验室保存

#### 1.1.2 试剂

Restriction Enzymes Fast Digest<sup>®</sup>购于赛默飞世尔科技公司; DreamTaq Green PCR Master Mix 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Prime STAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase (premix) 购于日本 TaKaRa 公司; HiFi DNA Assembly Cloning Kit 试剂盒购于美国 NEB 公司; 质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒和 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒均购于广州捷倍斯生物科技有限公司; 引物于上海生工有限公司合成; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基: 1%蛋白胨, 0.5%酵母提取物, 1%氯化钠(固体含2%琼脂)。

SOC 培养基: 31.4 g SOC 固体粉末溶于 1000 mL 水, 116℃高温灭菌 30 min。

LBS 培养基: LB 液体培养基, 0.5 mol/L 山梨醇。

发酵培养基: 1.5%蛋白胨, 3%酵母提取物, 1%氯化钠, 2%可溶性淀粉。

### 1.2 仪器

梯度 PCR 仪 Veriti<sup>®</sup> 96-Well Thermal Cycler 购于美国 Applied Biosystems 公司; 移液枪、离心机、电转化仪购于德国 Eppendorf 公司; 浸入式水平电泳系统购于美国 BIO-RAD 公司; 紫外可见分光光度计 NanoDrop 1000 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; M200 多功能酶标仪购于德国 TECAN 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 单启动子表达质粒的构建、克隆及转化

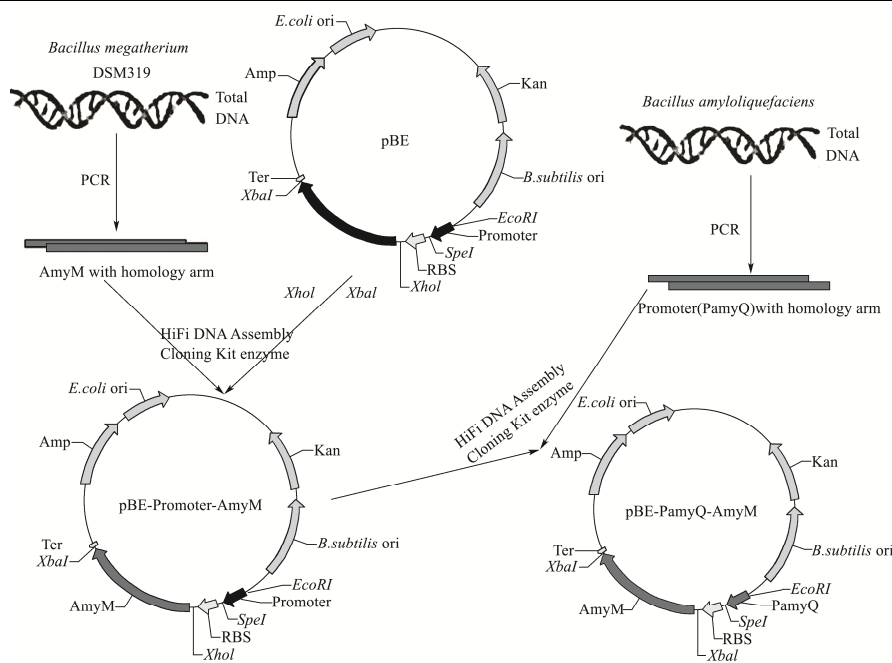


图1 重组质粒 pBE-P<sub>amyQ</sub>-AmyM 的构建流程

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pBE-P<sub>amyQ</sub>-AmyM

1.3.1.1 pBE-AmyM 表达质粒的构建及克隆

表1 引物序列

Table 1 List of primers

引物名称	序列 (5'→3')
F-AmyM	actagtcaaaaggagagggatgaacagctatgtaaaaaagg
R-AmyM	ctattctcaagggtttatgatgatgatgatgccaattatctgtataagtcg

注:下划线分别表示与表达载体重叠的序列和 18 bp 6×His 标签序列。

以 *B.megatherium* DSM 319 基因组为模板,设计特异性引物 F-AmyM 和 R-AmyM (表 1),由 PCR 反应扩增得到 β-淀粉酶基因(基因的 C 末段含 6×His 标签序列,基因序列见附表 1),产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定和胶回收。用 *XhoI* 和 *XbaI* 酶切 pBE 质粒去除原有蛋白序列,胶回收载体片段,按照 HiFi DNA Assembly Cloning Kit 试剂盒说明书,将载体和 β-淀粉酶基因片段连接,将连接液转化至 *E.coli stellar* 感受态细胞,热击后加入 SOC 培养液复苏 1 h,吸取适当复苏液涂抗性 LB 固体平板(含 Amp),37 °C 恒温过夜培养,挑取阳性转化子,筛选验证正确后,送至测序公司测序,验证 β-淀粉酶碱基序列。

1.3.1.2 pBE-promoter-AmyM 表达质粒的构建及克隆

以 *B.subtilis* 168 基因组为模板,通过 PCR 扩增得到启动子 P<sub>B.S 168-aprE</sub>、P<sub>B.S 168-amy</sub>、P<sub>fusA</sub>、P<sub>gsiB</sub>、P<sub>ygfD</sub>、P<sub>pgk</sub>、P<sub>sodA</sub>、P<sub>yzwA</sub>、P<sub>gapA</sub>、P<sub>tsf</sub>、P<sub>nprB</sub>、P<sub>43</sub>、P<sub>strfA</sub>、P<sub>hag</sub>、P<sub>veg</sub>、P<sub>ydzA</sub>、P<sub>spovG</sub> 片段,以 *B.licheniformis* 基因组为模板,通过 PCR 扩增得到启动子 P<sub>B.liche-apr</sub>、P<sub>amyL</sub> 片段,以 *B.amyloliquefaciens* 基因组为模板,通过 PCR 扩增

得到启动子 P<sub>B.amy-apr</sub>、P<sub>amyQ</sub>、P<sub>sigW</sub> 片段,产物经琼脂糖凝胶电泳和胶回收。用 *EcoRI* 和 *SpeI* 酶切 pBE-AmyM 质粒去除原有启动子序列,胶回收载体片段,分别连接启动子和载体片段,构建 pBE-promoter-AmyM 表达质粒(以 pBE-P<sub>amyQ</sub>-AmyM 为例),如图 1 所示,并按照 1.3.1.1 的方法转化至 *E.coli stellar* 感受态细胞中,挑取阳性转化子,筛选验证正确后,送至测序公司测序,验证启动子序列。

1.3.1.3 pBE-promoter-AmyM 质粒电转进宿主 Bacillus subtilis ATCC 6051Δ10

将测序正确的 pBE-promoter-AmyM 质粒电转至宿主中,电转化方法参照文献进行<sup>[22]</sup>,取 10 uL 质粒到 *B.subtilis* ATCC 6051Δ10 感受态细胞中电转,电转结束后立即加入 890 μL 的 LBS 培养液,37 °C 孵育 2~3 h 后,将复苏液涂布在抗性 LB 固体平板(含 Kan),37 °C 恒温过夜培养,挑取阳性转化子并提质粒,进行琼脂糖凝胶电泳,验证质粒和酶切片段大小,得到构建成功的重组菌株 pBES01 (P<sub>amyQ</sub>)、pBES02 (P<sub>B.amy-apr</sub>)、pBES03 (P<sub>amyL</sub>)、pBES04 (P<sub>B.liche-apr</sub>)、pBES05 (P<sub>B.S 168-amy</sub>)、pBES06 (P<sub>B.S 168-aprE</sub>)、pBES07 (P<sub>fusA</sub>)、pBES08 (P<sub>gsiB</sub>)、pBES09 (P<sub>ygfD</sub>)、pBES10 (P<sub>pgk</sub>)、pBES11 (P<sub>sodA</sub>)、pBES12 (P<sub>yzwA</sub>)、pBES13 (P<sub>gapA</sub>)、pBES14 (P<sub>tsf</sub>)、pBES15 (P<sub>nprB</sub>)、pBES16 (P<sub>sigW</sub>)、pBES17 (P<sub>43</sub>)、pBES18 (P<sub>strfA</sub>)、pBES19 (P<sub>hag</sub>)、pBES20 (P<sub>veg</sub>)、pBES21 (P<sub>ydzA</sub>)、pBES22 (P<sub>spovG</sub>)。

1.3.2 β-淀粉酶酶活力测定

参考文献<sup>[23]</sup>用 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS 法) 并做适当调整: 取 0.94 mL 用  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液配制的 1% 可溶性淀粉作为反应底物 (pH 6.0), 于 40 °C 预热 5 min, 加 0.06 mL 酶液, 混合均匀, 40 °C 保温 15 min, 取 0.40 mL 反应液加 1.20 mL DNS 试剂, 沸水浴加热 10 min, 冷却至室温, 取 0.20 mL 加去离子水 0.80 mL, 混合均匀后于 540 nm 波长测 OD 值。以标准麦芽糖溶液的不同浓度作为 X 轴, 在 540 nm 波长下测得反应液的 OD 值为 Y 轴绘制标准曲线。一个酶活力单位 (U) 定义为: 在 pH 6.0、40 °C 条件下, 每小时分解可溶性淀粉产生相当于 1 mg 麦芽糖所需的酶量。

### 1.3.3 单启动子对 $\beta$ -淀粉酶表达水平的影响

选择 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 作为对照菌株, 将 pBES01-pBES22 等 22 株重组菌接种至含有 3 mL (24 孔板) LB 液体培养基中作为种子液, 37 °C、220 r/min 培养 24 h, 测定菌体浓度, 按等生物量转接至含有 3 mL (48 孔板) 发酵培养基中, 37 °C、220 r/min 培养 30 h, 取发酵液于 4 °C、12000 r/min 离心 15 min, 测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活, 筛选出 10 株高表达菌株。将筛选的菌株和作为对照的 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 菌株, 接种至含有 50 mL (500 mL 平底摇瓶) LB 液体培养基中作为种子液, 按照上述方法转接至含有 100 mL (500 mL 挡板摇瓶) 发酵培养基中, 37 °C、220 r/min 培养, 从 21 h 开始每隔 3 h 取样, 测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活和菌体生长量, 筛选出高表达的单启动子重组菌株。

### 1.3.4 双启动子表达质粒的构建及对 $\beta$ -淀粉酶表达水平的影响

以筛选的单启动子重组菌株为模板, 扩增启动子序列, 构建含有双启动子表达质粒 pBED01 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{43}$ )、pBED02 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{amyQ}$ )、pBED03 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{sigW}$ )、pBED04 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{spovG}$ )、pBED05 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{gsiB}$ )、pBED06 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{B.liche-apr}$ )、pBED07 ( $\text{P}_{43}\text{-P}_{nprB}$ ), 电转化至宿主 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 中, 摇瓶培养, 测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活, 筛选出高表达的双启动子重组菌株。

### 1.3.5 突变型 AmyM-CRE 表达质粒的构建及对 $\beta$ -淀粉酶表达水平的影响

以菌株 pBED01 为模板, 按照表 2 所示, 设计碱基突变引物, 扩增相应片段, PCR 反应体系: 质粒 (浓度 100 ng/ $\mu\text{L}$  左右) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ Prime STAR 25  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足到总体积为 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 产物经验证大小正确后, 胶回收目的片段并测定浓度。按照 1.3.1.1 方法, 把带有突变位点的片段连接, 将连接液转化至 *E.coli stellar* 感受态细胞中, 挑取阳性转

化子进行验证和测序, 将测序正确的转化子电转至宿主 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 中, 以 pBED01 菌株作为对照, 摇瓶培养, 测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活。

表 2 定点突变 CRE 位点的不同碱基

Table 2 Site-directed mutation of different bases at CRE site

CRE 高度保守位点	TGWNANCGNTNWCA
相应氨基酸	Phe Val Asn Ala Phe Ile
原始菌株	TTT GTT AAC GCT TTC ATT
pBE01	TTC GTT AAC GCT TTC ATT
pBE02	TTT GTT AAT GCT TTC ATT
pBE03	TTT GTT AAT GCC TTC ATT
pBE04	TTT GTT AAT GCC TTT ATT
pBE05	TTC GTT AAT GCC TTT ATT

### 1.3.6 重组 $\beta$ -淀粉酶的纯化和 Western blot 鉴定

重组  $\beta$ -淀粉酶纯化采用镍柱亲和层析法<sup>[24]</sup>。重组  $\beta$ -淀粉酶带有 His 标签与层析柱上的  $\text{Ni}^{2+}$  发生螯合反应而被吸附, 从而得到纯度较高的蛋白酶液。发酵上清液在 4 °C、12000 r/min 离心 15 min 后, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 使用 GE 公司的 5 mL HisTrap TMHP 层析柱, 采用 10% 梯度洗脱柱子, 流速 1.0 mL/min, 收集有峰的洗脱液, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测纯化效果, 并进行 Western blot 特异性鉴定。

### 1.3.7 重组 $\beta$ -淀粉酶在糖化反应过程中的应用

将一定质量的麦芽糊精烘干至恒重后, 称取 30 g 溶于 100 mL 去离子水中, 配置 30% (W/V) 的麦芽糊精溶液, 为提高麦芽糖转化率, 使酶在最适条件下反应, 故调节麦芽糊精溶液 pH 为 6.0, 放入 50 °C 恒温水浴摇床中预热后, 分别加入重组  $\beta$ -淀粉酶 50、100、200、400 U/g (干麦芽糊精), 将反应液倒入 500 mL 摇瓶中, 置于 50 °C 水浴摇床, 转速设定为 100 r/min, 反应 48 h 后, 煮沸样品终止反应, 按 1:1 比例加入色谱纯乙腈, 静置沉淀 2 h 后, 取上清液 8000 r/min 离心 20 min, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔膜过滤, 通过 HPLC 检测反应产生麦芽糖的量, 根据标准曲线计算麦芽糖转化率。

色谱条件: 色谱仪为 Waters 2695-2414, 检测器为示差检测器, 色谱柱为 Aminex HPX-87H (Bio-Rad), 柱温为 60 °C, 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\beta$ -淀粉酶基因克隆及序列分析

通过 PCR 扩增得到  $\beta$ -淀粉酶基因全长 1656 bp,

共编码 551 个氨基酸，其中有 6 个组氨酸和一个终止密码子 ( $\beta$ -淀粉酶基因序列见附件 1)，经 SignalP 4.1 在线预测分析，表明该蛋白具有 N-端信号肽，其中 1~20 位为信号肽序列， $\beta$ -淀粉酶分子量约为 58 ku。经比对  $\beta$ -淀粉酶基因编码区存在 CRE 位点：TGTTAACGCTTCA，和高保守序列完全一致。

### 2.2 不同单启动子高效表达菌株的筛选

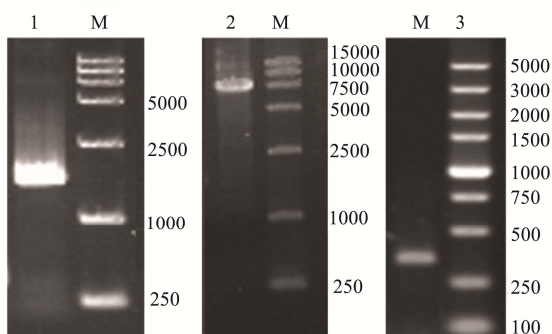


图 2 pBE-AmyM 载体片段与 PCR 扩增片段电泳图

Fig.2 Electropherogram of pBE-AmyM and PCR products

注：M: DNA marker; 1:  $\beta$ -淀粉酶基因; 2: pBE 载体片段; 3:  $P_{sigW}$  启动子 PCR 产物。

用 *XhoI* 和 *XbaI* 酶切得到 pBE 载体片段 (图 2)，大小为 7351 bp，琼脂糖凝胶电泳验证载体片段大小与预期一致，经 PCR 扩增得到单启动子片段 (图 2，以  $P_{sigW}$  启动子为例，其余启动子电泳图见附件 2，启动子序列见附件 3)，最后经测序验证 pBE-Promoter-AmyM 质粒构建正确。

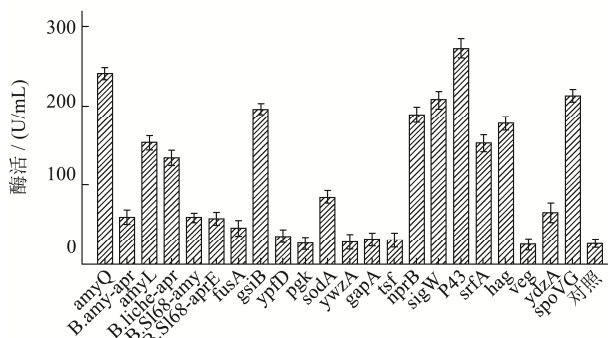


图 3 不同单启动子重组菌株酶活水平

Fig.3 Enzyme activity levels of recombinant strains with single promoter

将构建成功的大肠杆菌菌株提质粒，电转至宿主 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10，接种发酵培养基培养 30 h 后，测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活 (图 3)，可看出不同启动子介导  $\beta$ -淀粉酶酶活差异较大，其中 pBES01 ( $P_{amyQ}$ )、pBES03 ( $P_{amyL}$ )、pBES04 ( $P_{B.liche-apr}$ )、pBES08 ( $P_{gsiB}$ )、pBES15 ( $P_{nprB}$ )、pBES16 ( $P_{sigW}$ )、pBES17 ( $P_{43}$ )、pBES18 ( $P_{srfA}$ )、pBES19 ( $P_{hag}$ )、pBES22 ( $P_{spovG}$ )

菌株上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活高于其他启动子。

选取 10 株高表达菌株摇瓶培养，测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活 (图 4a) 和菌体生长量 (图 4b)，研究发现大部分菌株从 24 h 开始进入稳定期，酶活水平大多在 27 h 时达到最高，其中由  $P_{43}$  介导的菌株  $\beta$ -淀粉酶酶活可达到 1165.82 U/mL，为单启动子介导表达的最高水平，随着时间的延长酶活降低较快，这可能和  $\sigma$  因子有关，它是 RNA 聚合酶识别启动子序列的关键因子，启动子活力通过  $\sigma$  因子与生长时期相关联，*B.subtilis* 168 来源的胞苷脱氨酶启动子  $P_{43}$ ，是由  $\sigma_A$  和  $\sigma_B$  分别识别两个重叠的-10 区和-35 区，启动强度对于多数目的蛋白较强，但其  $\sigma$  因子调控基因表达时期为对数生长期和稳定期，因此在稳定前期  $P_{43}$  启动子介导的  $\beta$ -淀粉酶酶活最高，随着菌体生长到稳定后期，则不再有转录活性，酶活表达水平开始降低<sup>[25]</sup>。

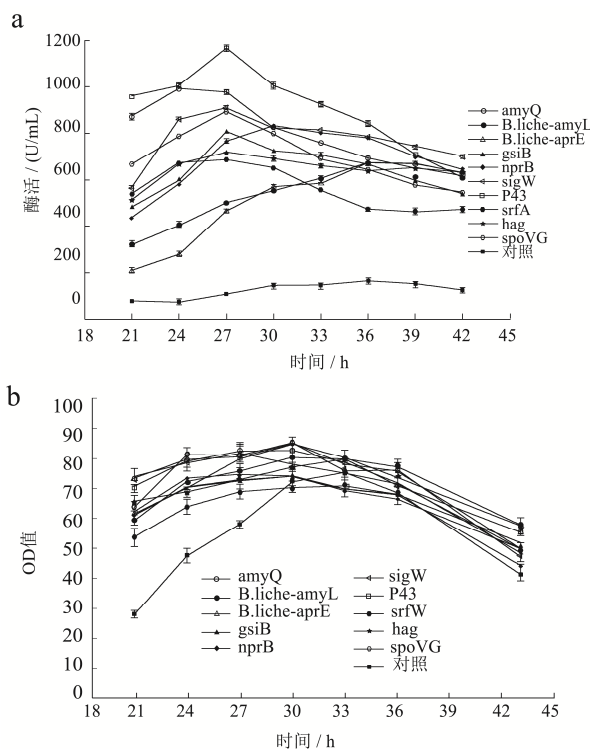


图 4 单启动子重组菌株酶活水平以及菌体生长量

Fig.4 Enzyme activity expression levels of recombinant strains with single promoter and bacterial growth

注：a:  $\beta$ -淀粉酶酶活水平; b: 菌体生长量。

### 2.3 不同双启动子高效表达菌株的筛选

对重组菌株 pBE- $P_{43}$ -promoter-AmyM 分别在 27 h、30 h 和 33 h 取上清液，测定  $\beta$ -淀粉酶酶活，通过比较发现：菌株 pBED01 ( $P_{43}$ - $P_{43}$ ) 酶活水平高于其他菌株 (图 5a); 菌株 pBED03 ( $P_{43}$ - $P_{sigW}$ ) 酶活水平在 30 h 达到最高，之后开始降低 (图 5b)，说明两个启动子串联表达时，会延长蛋白酶表达的时间；双启

动子介导  $\beta$ -淀粉酶酶活水平明显高于单启动子, 但并无明显规律, 这可能和启动子的性质以及目的蛋白有关系, 不同的目的蛋白对启动子有一定的匹配度。

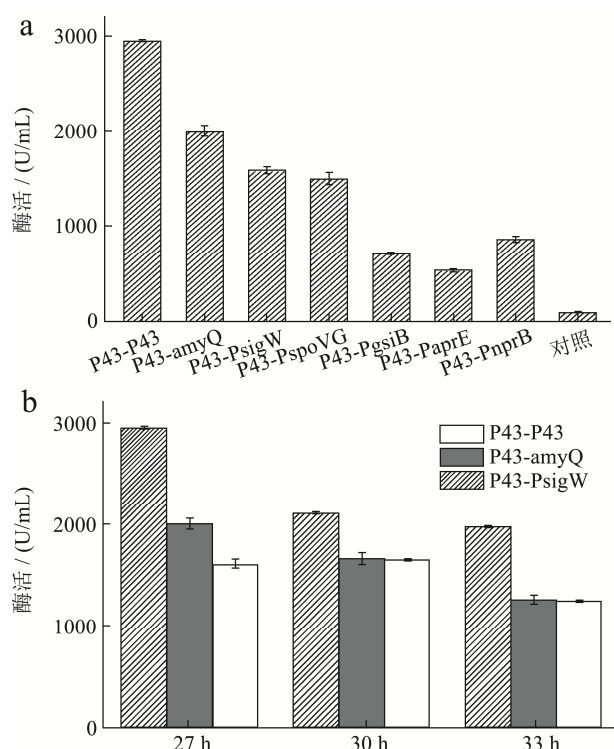


图5 双启动子重组菌株在 27 h 的酶活水平和在不同时间的酶活水平对比

Fig.5 The enzyme activity level of recombinant strains with different dual-promoters at 27 h and the comparison of expression levels at different times

注: a: 不同菌株酶活水平对比; b: 不同时间酶活水平对比。

## 2.4 突变型 AmyM-CRE 表达菌株的筛选

定点突变 CRE 位点碱基, 获得五株突变菌株, 摇瓶培养, 测定上清液中  $\beta$ -淀粉酶酶活(图 6)。由 pBE01 和 pBE02 可知, 当只突变不同位点的一个碱基时, 两株菌表达  $\beta$ -淀粉酶酶活水平相当, 由 pBE03 可知, 当突变两个碱基位点时,  $\beta$ -淀粉酶酶活得到了进一步提升, 但当突变三个和四个碱基之后, pBE03、pBE04 和 pBE05 菌株  $\beta$ -淀粉酶酶活水平基本无变化, 这可能是定点突变两个高保守的 CRE 位点后, 细胞内阻遏复合物已不能与 CRE 位点结合, 因此 CCR 效应已在最大程度上得到缓解,  $\beta$ -淀粉酶酶活水平相较未突变前提高 58.03%。

## 2.5 重组 $\beta$ -淀粉酶纯化和 Western blot 鉴定

对带有 His 标签的重组  $\beta$ -淀粉酶发酵上清液处理后, 进行镍柱亲和层析纯化(图 7a), 并进行 SDS-PAGE 蛋白电泳(图 7b), 结果显示存在单一的目的条带,

经 Western blot 特异性鉴定(图 7c), 结果显示为一条特异性免疫反应条带, 证明为表达的目的蛋白  $\beta$ -淀粉酶。

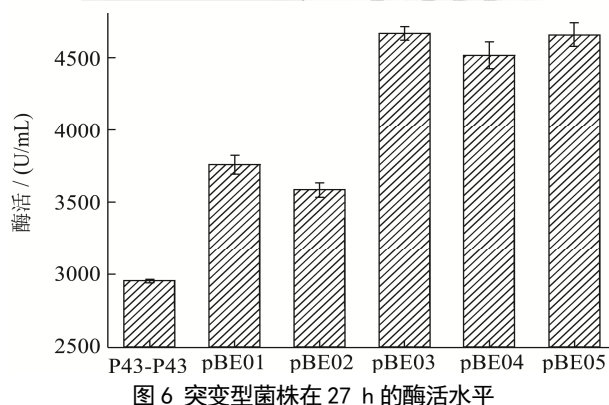


图6 突变型菌株在 27 h 的酶活水平

Fig.6 The expression level of enzyme activity of mutant strains at 27 h

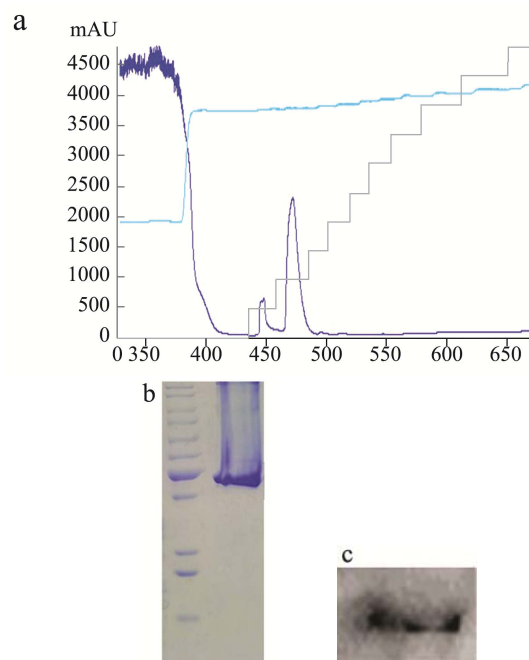


图7 重组  $\beta$ -淀粉酶纯化图谱、纯化后的重组  $\beta$ -淀粉酶 SDS-PAGE 分析、Western blot 特异性鉴定

Fig.7 The process of purification of recombinant  $\beta$ -amylase、SDS-PAGE analysis and Western blot specific identification

注: a: 纯化图谱; b: 纯化液 SDS-PAGE 分析; c: Western blot 分析。

## 2.6 重组 $\beta$ -淀粉酶在糖化过程中的应用效果

### 2.6.1 标准曲线的绘制

用麦芽糖标品配置浓度为 0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL、3.0 mg/mL、4.0 mg/mL、5.0 mg/mL、10.0 mg/mL 的标准溶液，按照 1.3.6 的实验方法，测定标准麦芽糖溶液的峰图（图 8a），由色谱图看出，麦芽糖出峰时间为 7.08 min，色谱图中无干扰峰，峰图形状标准，可用于定量分析样品中麦芽糖含量，由标准曲线可看出（图 8b），麦芽糖标准曲线的线性方程为  $y=69484x-796.72$ ， $R^2=0.9998$ ，线性关系较好。

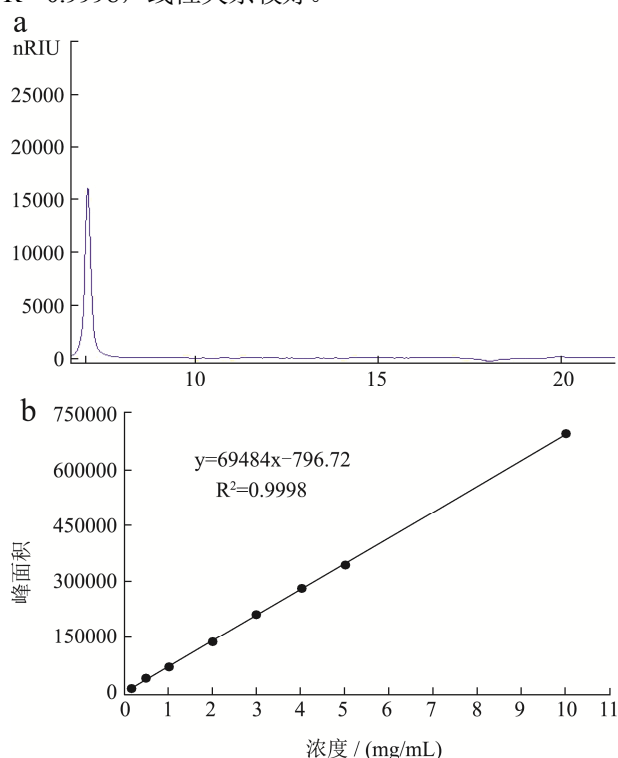


图 8 麦芽糖标品出峰图和标准曲线

Fig.8 Peak diagram of maltose standard product and standard curve

注：a：HPLC 峰图；b：标准曲线。

### 2.6.2 重组 $\beta$ -淀粉酶不同加入量对麦芽糖转化率的影响

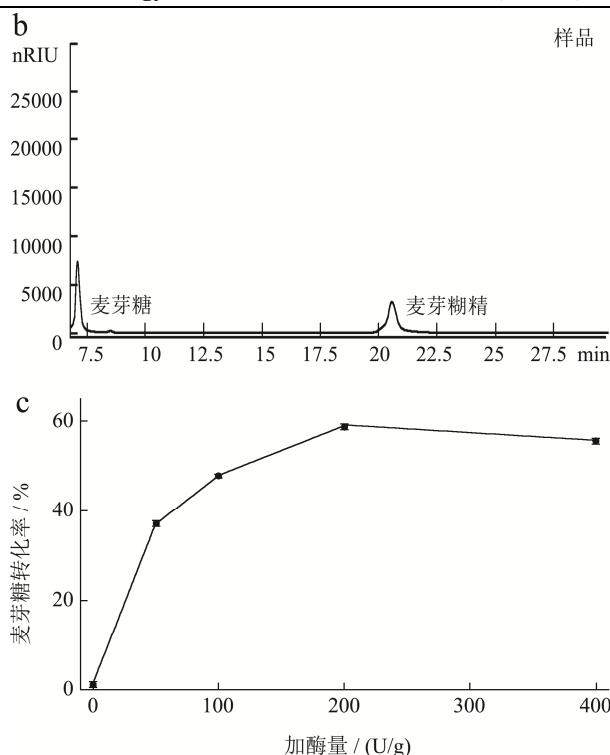
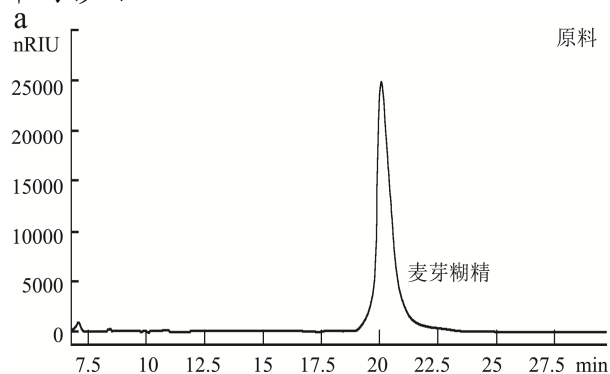


图 9 样品色谱图和重组  $\beta$ -淀粉酶不同加入量对麦芽糖转化率的影响

Fig.9 Chromatogram and the effect of different amounts of  $\beta$ -amylase on maltose conversion rate

注：a、b：HPLC 峰图；c：麦芽糖转化率。

随着重组  $\beta$ -淀粉酶加入量的增加，麦芽糖转化率在一定范围内呈升高趋势，当加酶量达到 200 U/g 时，麦芽糖转化率达到最高水平为 57.62%，而当加酶量继续增大时，麦芽糖转化率则不再继续提高，这可能是底物麦芽糊精已经消耗完全（图 9）。

## 3 结论

3.1 枯草芽孢杆菌作为宿主菌表达异源蛋白，技术比较成熟，菌株生长特性强，蛋白分泌背景清晰，并且其独特的内源性代谢模式，提高了蛋白分泌加工效率，不产生包涵体，表达的蛋白直接分泌在胞外培养基中，简化蛋白下游加工分离纯化程序，本实验采用的宿主 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 是通过温敏型质粒 pKS 无痕敲除体系，对野生菌的 10 个基因进行敲除，敲除的基因对菌株生长无影响，但有利于维持异源蛋白表达的稳定性，提高表达水平，并且在发酵过程中起泡较少<sup>[26]</sup>，因此本实验选择 *B.subtilis* ATCC 6051 $\Delta$ 10 作为发酵菌株。随着生物信息学的发展，芽孢杆菌的启动子在转录组水平上得到了深入的研究，利用转录组分析技术可以高通量筛选表达水平高的强启动子，Martin 等<sup>[27]</sup>研究也证实了启动子与其调控的基因水平间呈正相关，因此本实验选择转录组中高表达基因的启动

子, 构建重组菌株, 调控 $\beta$ -淀粉酶表达水平。

3.2 本实验分别构建了 22 株单启动子和 7 株双启动子介导 $\beta$ -淀粉酶表达的菌株, 其中双启动子 P<sub>43</sub>-P<sub>43</sub>介导的重组菌株在摇瓶培养 27 h 时,  $\beta$ -淀粉酶酶活水平达到 2950.76 U/mL, 是单启动子介导表达的 2.53 倍, 通过碱基突变, 有效缓解碳代谢阻遏效应, 重组 $\beta$ -淀粉酶酶活水平最高可达到 4663.03 U/mL, 为 $\beta$ -淀粉酶工业化生产提供了理论支持。

3.3 对重组 $\beta$ -淀粉酶进行镍柱亲和层析纯化和 Western blot 特异性鉴定, 结果为单一目的条带, 证明 $\beta$ -淀粉酶表达成功, 同时将重组 $\beta$ -淀粉酶应用于糖化反应中, 得到麦芽糖转化率为 57.62%。综上, 本研究为重组 $\beta$ -淀粉酶的工业化生产提供了理论依据, 后续可以进一步研究发酵条件的优化, 以得到更高表达的酶活水平。

### 参考文献

- [1] Kaplan F, Guy C L. Beta-amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(3): 1674-1684
- [2] 张剑, 林庭龙, 秦瑛, 等.  $\beta$ -淀粉酶研究进展[J]. *中国酿造*, 2009, 28(4): 5-8  
ZHANG Jian, LIN Ting-long, QIN Ying, et al. Research development on  $\beta$ -amylase [J]. *China Brewing*, 2009, 28(4): 5-8
- [3] LI Xin, YU Hui-ying. Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp LY9 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(11): 1837-1843
- [4] Fogarty W M, Griffin P J. Purification and properties of  $\beta$ -amylase produced by *Bacillus polymyxa* [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2010, 25(3): 229-238
- [5] Vajravijayan S, Pletnev S, Mani N, et al. Structural insights on starch hydrolysis by plant  $\beta$ -amylase and its evolutionary relationship with bacterial enzymes [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113(1): 329-337
- [6] 李猛, 陈利飞, 杨建楼, 等. 产 $\beta$ -淀粉酶菌株的筛选及 $\beta$ -淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆与表达[J]. *生物技术通报*, 2014, 12: 161-167  
LI Meng, CHEN Li-fei, YANG Jian-lou, et al. The isolation of beta-amylase-producing bacteria and cloning, expression of beta-amylase gene in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014, 12: 161-167
- [7] Balls A K, Thompson R R, Walden M K, et al. A crystalline protein with  $\beta$ -amylase activity, prepared from sweet potatoes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1946, 163(163): 571
- [8] Yamaguchi Shotaro. The quest for industrial enzymes from microorganisms [J]. *Bioscience Biotechnol Biochem*, 2017, 81(1): 54-58
- [9] Yamashiro Kan, Yokobori Shin-Ichi, Koikeda Satoshi, et al. Improvement of *Bacillus circulans* beta-amylase activity attained using the ancestral mutation method [J]. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 2010, 23(7): 519-528
- [10] 亓旭辉. *Bacillus flexus*  $\beta$ -淀粉酶在短小芽孢杆菌中的重组表达分子改造及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017  
QI Xu-hui. Study on heterologous expression of *Bacillus flexus*  $\beta$ -amylase in *Brevibacillus choshinensis* and molecular modification and its application [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017
- [11] Nanmori T, Nagai M, Shimizu Y, et al. Cloning of the beta-amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1993, 59(2): 623-627
- [12] Kawazu T, Nakanishi Y, Uozumi N, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for enzymatically active fragments of the *Bacillus polymyxa* beta-amylase [J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(4): 1564-1570
- [13] 蒙健宗, 梁莲华, 周礼芹, 等. 渗透压诱导表达重组 *Clostridium thermosulfurogenes*  $\beta$ -淀粉酶基因[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(6): 6-10  
MENG Jian-zong, LIANG Lian-hua, ZHOU Li-qin, et al. Osmotic pressure induced expression of recombinant *Clostridium thermosulfurogenes*  $\beta$ -amylase [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2011, 37(6): 6-10
- [14] Ray R R, Jana S C, Nanda G, et al.  $\beta$ -amylase from *Bacillus megaterium* [J]. *Folia Microbiologica*, 1994, 39(6): 567-570
- [15] DUAN Xu-guo, SHEN Zheng-yan, ZHANG Xin-yi, et al. Production of recombinant beta-amylase of *Bacillus aryabhattai* [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2019, 49(1): 88-94
- [16] GUAN Cheng-ran, CUI Wen-jing, CHENG Jin-tao, et al. Construction of a highly active secretory expression system via an engineered dual promoter and a highly efficient signal peptide in *Bacillus subtilis* [J]. *New Biotechnology*, 2016, 33(3): 372-379
- [17] YANG Ming-ming, ZHANG Wei-wei, JI Sheng-yue, et al. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system



- [J]. Plos One, 2013, 8(2): e56321
- [18] WU Shu-ming, FENG Chi, ZHONG Jin, et al. Enhanced production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* by promoter optimization [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(1): 99-106
- [19] 吴艳, 顾阳, 任聪, 等. 微生物分解代谢物控制蛋白 CcpA 的研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(9): 882-890  
WU Yan, GU Yang, REN Cong, et al. Recent research on catabolite control protein A in microorganisms [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2011, 23(9): 882-890
- [20] Rosangela Marasco, Lidia Muscariello, Manuela Rigano, et al. Mutational analysis of the bglH catabolite-responsive element (cre) in *Lactobacillus plantarum* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 208(1): 143-146
- [21] Lee J S, Wittchen K D, Stahl C, et al. Cloning, expression and carbon catabolite repression of the bamM gene encoding  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* DSM319 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(1-2): 205-211
- [22] 廖瑜玲. 解淀粉芽孢杆菌转录组学及其表达元件的挖掘与应用 [D]. 广州: 华南理工大学, 2016  
LIAO Yu-ling. Transcriptome of *Bacillus amyloliquefaciens* and excavations and application of novel expression elements [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016
- [23] Sorel Tchewonpi Sagu, Emmanuel Jong Nso, Thomas Homann, et al. Extraction and purification of beta-amylase from stems of *Abrus precatorius* by three phase partitioning [J]. Food Chemistry, 2015, 183(15): 144-153
- [24] 张玲敏, 王斌, 潘力, 等. 南极假丝酵母脂肪酶 B 在黑曲霉中的分泌表达及其硅藻土固定化应用 [J]. 食品科学, 2019, 40(14): 107-114  
ZHANG Ling-min, WANG Bin, PAN Li, et al. Secretory expression of *Candida antarctica* lipase B in *Aspergillus niger* and its application in diatomite immobilization [J]. Food Science, 2019, 40(14): 107-114
- [25] YANG Sen, DU Guo-cheng, CHEN Jian, et al. Characterization and application of endogenous phase-dependent promoters in *Bacillus subtilis* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2017, 101(10): 4151-4161
- [26] LIU Xin, WANG Hai, WANG Bin, et al. Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC 6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 163-175
- [27] Jeffrey Martin, ZHU Wen-han, Karla D Passalacqua, et al. *Bacillus anthracis* genome organization in light of whole transcriptome sequencing [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(Suppl 3): 1-13

## (上接第 233 页)

- [30] 祝超智. 金华火腿抗氧化肽的活性研究及组分鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015: 55-70  
ZHU Chao-zhi. Study on the activity and component identification of antioxidant peptides from Jinhua ham [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015: 55-70
- [31] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182
- [32] 李致瑜, 张翀, 田玉庭, 等. 大黄鱼内脏抗氧化肽的稳定性 [J]. 现代食品科技, 2016, 36(1): 1-11  
LI Zhi-yu, ZHANG Chong, TIAN Yu-ting, et al. Stability of antioxidant peptides extracted from *Pseudosciaena crocea* viscera [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(1): 1-11
- [33] ZHU Chao-zhi, ZHANG Wan-gang, KANG Zhuang-yi, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham [J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789
- [34] 周存山, 秦晓佩, 余筱洁, 等. 绿鳍马面鲉鱼皮蛋白抗氧化肽模拟胃肠消化制备 [J]. 农业机械学报, 2015, 46(8): 211-216  
ZHOU Cun-shan, QIN Xiao-pei, YU Xiao-jie, et al. Preparation of antioxidant peptides from skin protein of *Takifugu fasciatus* [J]. Journal of Agricultural Machinery, 2015, 46(8): 211-216