

南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 产 α -淀粉酶 Amy3809 的表达、性质及其降解特性

谷晓倩¹, 李江^{1*}, 潘爱红², 林学政¹

(1. 自然资源部 第一海洋研究所 海洋生态环境科学与技术重点实验室, 山东 青岛 266061;

2. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266061)

摘要:对具有高淀粉酶活性的南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 的全基因组数据进行了分析和筛选, 筛选获得 α -淀粉酶疑似序列 amy3809, 并采用基因工程手段对该基因的功能和性质进行验证和分析。首先, 以淀粉酶 Amy3809 的完整开放阅读框(ORF)为模板设计特异引物, 克隆获得 amy3809 的全序列并对其进行重组表达, 获得的重组蛋白采用镍柱进行分离纯化; DNS-还原糖法测定重组酶的酶学性质; 薄层层析(TLC)技术对 Amy3809 的酶解产物进行分析。实验结果: 1) 克隆获得的 amy3809 成功地连接到 pET-30a 载体, 并在工程菌 *E. coli* BL21(DE3) 中实现了高效表达, 纯化的重组酶 Amy3809 分子量为 67 kDa; 2) 重组酶 Amy3809 在 10~40 °C 的范围内仍能保持 85% 以上的酶活, 但随着温度的升高酶活迅速降低, 70 °C 时几乎失活, 表明该酶具有良好的低温耐受特性及热敏感性; 3) 最适 pH 为 7.0, 在 pH 5.0~10.0 的范围内仍能保持 50% 以上的活性; 4) 金属离子 Na⁺, K⁺ 和 Ca²⁺ 均能提高 Amy3809 的活性, 而 Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ 和 EDTA 则能显著降低 Amy3809 的活性; 5) Amy3809 的酶解产物主要为麦芽四糖、麦芽三糖、麦芽糖和葡萄糖。由此可知, 南极菌产的 α -淀粉酶 Amy3809, 具有良好的低温耐受特性, 热敏感性和较广的 pH 耐受范围, 并能够有效地将淀粉降解为低聚糖和葡萄糖, 因而具有潜在的工业应用前景。

关键词: α -淀粉酶; 表达; 酶学性质; 酶解特性

中图分类号: TQ925.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2020)01-0081-10

doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2020.01.009

引用格式: GU X Q, LI J, PAN A H, et al. Expression and characterization of α -amylase Amy3809 from Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. A211-5[J]. Advances in Marine Science, 2020, 38(1): 81-90. 谷晓倩, 李江, 潘爱红, 等. 南极菌 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 产 α -淀粉酶 Amy3809 的表达、性质及其降解特性[J]. 海洋科学进展, 2020, 38(1): 81-90.

α -淀粉酶(α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase; EC 3.2.1.1)是一种内切葡糖苷酶,能够特异性的作用于 α -1,4 糖苷键,从而将可溶的淀粉、糖原等大分子糖类物质降解为糊精、麦芽糖以及葡萄糖等小分子量的还原糖,从而迅速降低了淀粉的黏度,起到液化作用,所以 α -淀粉酶也称为液化酶^[1]。 α -淀粉酶主要归属于糖苷水解酶(Glycoside Hydrolase, GH)13,57 和 119 家族,但绝大多数为 GH13 家族成员(<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>)。

α -淀粉酶广泛地来源于动物、植物和微生物,特别是微生物来源的 α -淀粉酶由于生产成本低、生产工艺简单高效,因而广泛地应用于食品、纺织、发酵、造纸等领域^[2-3]。目前,对来源于 *Bacillus* sp. 的 α -淀粉酶研究最为深入,主要是由于该类酶具有良好的热稳定性^[4]。近年来,随着对 α -淀粉酶的工业应用要求不断提高,筛选和开发具有高催化活性、底物特异性、热稳定性、金属离子和变性剂耐受性及广泛 pH 适应性的特殊催化特性的 α -淀粉酶,成为工业应用领域关注的焦点^[5]。

收稿日期: 2018-08-01

资助项目: 海洋公益性行业科研专项项目——海藻寡糖应用关键技术与农用系列产品开发(201505026-4)

作者简介: 谷晓倩(1994-),女,硕士研究生,主要从事极端微生物多样性及其活性物质方面研究. E-mail: 2546983155@qq.com

*** 通讯作者:** 李江(1976-),男,副研究员,博士,主要从事极端微生物多样性及其活性物质方面研究. E-mail: lijiaang@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

在工业生产中,淀粉先要蒸煮糊化然后加入淀粉酶对其水解,但这种传统方法会消耗大量的热能进而使其生产成本提高。近年来,采用常温酶降解生淀粉的研究得到广泛的关注,目前,已发现了多个能够降解生淀粉的淀粉酶,这些酶能够在低于淀粉糊化的温度下直接对生淀粉进行降解,该工艺有效地降低了能耗,简化了操作流程,从而缩减了生产成本^[6-7],因此在诸多工业领域显示出重要的应用前景。

南极海域不同于淡水、土壤等陆地环境,具有低温、高盐和强辐射等环境特征,生存于其中的微生物具有一些与其特殊环境相适应的形态学、生理学和遗传学上的特异性,因而蕴藏着大量功能独特的低温酶资源。目前,已报道的淀粉酶大多来自陆地和海洋微生物^[8-12],而有关南极微生物的淀粉酶尚未见报道。本实验室在前期工作中,从南极沉积物中筛选获得了大量具有产淀粉酶活性的南极菌株,采用高通量测序技术获得了高产酶菌株 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 的全基因组数据,筛选获得了淀粉酶疑似序列 *amy3809*,并对其进行异源表达和酶学性质研究,以期获得具有潜在应用前景的高活性、高稳定性的 α -淀粉酶。

1 材料和方法

1.1 菌株

产淀粉酶菌株 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 分离自第 32 次南极科考采集的阿蒙森海深海沉积物(128°08'42"W, 71°53'55"S),纯化的菌株保存于自然资源部第一海洋研究所菌种库(-80 °C)。

1.2 试剂和材料

蛋白胨(Oxoid)、酵母粉(Oxoid);可溶性淀粉(天津市大茂化学试剂厂);IPTG(Solarbio);卡那霉素(Solarbio);麦芽糖标准样品(Miragen);*E. coli* BL21 (DE3)(北京全式金生物技术有限公司);表达载体 pET-30a(His · Tag)(Takara);Ni Sepharose(GE Healthcare);硅胶板(Merck KGaA);其他试剂为国产分析纯。

3,5-二硝基水杨酸溶液:182 g 四水合酒石酸钾钠溶解于 600 mL 蒸馏水中,加入 21 g NaOH,6.3 g DNS,5 mL 苯酚,5 g 亚硫酸钠,定容到 1 000 mL 容量瓶中,储存于棕色瓶中;展开剂:根据实验需求正丁醇、冰乙酸、蒸馏水按 2 : 1 : 1 的体积比配制;显色剂:量取 200 mL 的丙酮于 250 mL 烧杯中,再加入 4 g 二苯胺,再加入 4 mL 的苯胺,20 mL 的磷酸溶液,混匀后储存于棕色瓶中备用。

1.3 α -淀粉酶 *amy3809* 的克隆

1.3.1 引物的设计

以全基因组测序获得的淀粉酶基因 *amy3809* 完整 ORF 为模板,设计特异性扩增引物(<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>);分析序列的限制性内切酶位点,并在引物的 5'端和 3'端分别引入相应限制性内切酶位点,特异性引物由金斯瑞生物技术有限公司合成:上游引物(5'-CGCCATATGCAGTT-TATGTATCCGCAGTACTGT-3')添加 *Bam*HI 酶切位点;下游引物(5'-CCCAAGCTTTGTTAATACT-GCGCTGCTAAA-3')添加 *Xba*I 酶切位点

1.3.2 PCR 扩增

以南极菌 A211-5 基因组为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系(50 μ L):2 $\times$ Taq PCR MasterMix(Tiagen) 25 μ L,通用引物 27F、1492R 各 1 μ L,细菌基因组 DNA 模板 1 μ L,灭菌蒸馏水。

PCR 扩增程序:首先 95 °C 预变性 5 min,然后 95 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,扩增 30 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,扩增获得的 PCR 产物采用琼脂糖凝胶进行回收纯化。

1.4 α -淀粉酶基因 amy3809 的表达

1.4.1 表达载体的构建

采用 Bam H I/Xba I 内切酶分别对扩增的 PCR 产物和表达载体 pET-30a 进行双酶切,利用 T4 DNA Ligase 连接纯化的目的基因和表达载体,从而构建重组质粒 amy 粒 3809+pET-30a,并将其转化 TOP10 感受态细胞。重组菌接种于含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基中 37 °C 培养 16 h,涂布平板筛选阳性克隆。提取阳性克隆的重组质粒转化 E.coli BL21(DE3)表达宿主,转化的菌株涂布于 LB 固体平板(含 50 mg/L 卡那霉素)于 37 °C 培养 24 h。

1.4.2 重组质粒的鉴定

挑取在板上产生透明圈的重组菌,提取重组质粒,采用双酶切和测序两种手段对重组质粒的插入片段进行验证,测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成。

1.5 重组 α -淀粉酶 Amy3809 的纯化

按 1% 的接种量将重组菌接种在含卡那霉素(50 mg/L)的 50 mL LB 培养基中,37 °C,150 r/min 培养 6~7 h;从 50 mL 液体培养基中取 3 mL 菌液加到 300 mL 的液体培养基,振荡培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,16 °C,125 r/min 条件下培养 24 h;经过诱导的重组菌于 4 °C、9 000 r/min 的条件下离心 15 min,收集菌体;采用 pH 为 7.0 的 PBS 缓冲液重悬菌体,然后于 4 °C、10 000 r/min 的条件下离心 10 min,获得粗酶液。

收集的粗酶液采用 Ni-NTA His Tag Kit 进行纯化^[13],洗脱液为含有不同浓度咪唑(40,80,120,160,200 mmol/L)的 PBS 缓冲液(pH=7.0),将不同浓度的洗脱液进行合并,采用 SDS-PAGE 方法对重组蛋白的分子量和纯度进行鉴定。

1.6 重组 α -淀粉酶 Amy3809 的酶学性质研究

1.6.1 酶活测定方法^[14-15]

反应体系为:1 mL 粗酶液,1 mL 底物(2 mg/mL 淀粉溶于 pH 7.0 的磷酸缓冲液),50 °C 反应 30 min,采用 DNS 法测定水解产生的还原糖吸光值。酶活力单位定义:1 mL 酶液在 50 °C 和 pH=7.0 条件下 1 min 催化产生 1 μ g 还原糖(以葡萄糖计)所需的酶量。每组实验设 3 个平行,取平均值。

1.6.2 重组 α -淀粉酶 Amy3809 的性质

分别在 10,20,30,40,50,60 和 70 °C 的反应温度下测定酶活,以确定其最适反应温度;分别在 40,50,60 °C 的条件下保温 0,1,2,3,4,5,12,24 h,然后测定其残余酶活,确定该酶的热稳定性;分别采用不同 pH 范围的缓冲液:NaAC-HAC(pH 为 4.0~5.0), Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 为 6.0~8.0),Gly-NaOH(pH 为 9.0~10.0), Na_2HPO_4 -NaOH(pH=11.0),以测定其最适 pH;分别配制含 100 mmol/L EDTA, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} 的溶液,加入到稀释酶液中使其终浓度达到 5 mmol/L,以不加任何离子所测的酶活力定义为 100%,以测定金属离子对 Amy3809 的影响。

1.7 降解产物分析

将 1 mL 重组酶 Amy3809 与 1 mL 底物(2 mg/mL 淀粉溶于 pH 7.0 的磷酸缓冲液)在 50 °C 条件下反应 6 h,沸水浴 10 min 终止反应,离心备用。

1.7.1 薄层层析法(TLC)^[16]

吸取一定量的麦芽糖标准样品、葡萄糖标准样品和反应产物上清,点于硅胶板上放入加有 15 mL 展开剂的层析槽中进行层析。在通风橱内层析约 6 h,取出风干后用喷壶均匀喷洒显色剂于硅胶板上,等待风干后将硅胶板于 90 °C 烤箱中烘烤 10 min 左右,直至样品显色效果明显。

2 结果与分析

2.1 基因克隆及序列分析

通过特异性引物克隆获得的 α -淀粉酶基因 *amy3809* 序列全长为 1 866 bp, 编码 619 个氨基酸, 预测其理论分子量为 67 kDa。相似性比对结果表明, Amy3809 与 AmyAc-3 家族成员具有高度的相似性, 与: α -amylase fuliginea (WP_033029470.1), α -amylase MelDa3 (PLT24194.1), α -amylase ruthenica (WP_082079259.1) 和 α -amylase S3431 (WP_033039320.1) 序列的相似性高达 64% 以上 (图 1)。

alpha-amylase-fuliginea	NKKS VYVS AVLC S ALI ST. . GCSENNKP. . . . EQQAPAYTKS ELTKPVVYQVFTRLFGNTE TANVS WGTKEQNGVGKFADFND AALKGI	84
alpha-amylase-S3431	NKKS VYVP AVLC S ALI AT. . GCSENNKP. . . . EQQTPAHVQNELTKPVVYQVFTRLFGNTE TANVPMGTKEQNGVGKFADFND AALKGI	84
alpha-amylase-MelDa3	NKKS VYVP AVLC S ALI TS. . ACSNNNET. . . . EQQAPKQAQNELTKPVVYQVFTRLFGNTE TANVPMGTKEQNGVGKFADFND AALKGI	84
alpha-amylase-ruthenica	NKDNKLTITTLAGSLAVALLGCSENTSSSHS KDAEKLQDDPEQVQKPVVYQVFTRLFGNTKQTNKPMGTLS ENGVGKFADFND KALAGI	90
Amy3809	NKKS VYVS AVLC S ALI ST. . GCSENNKP. . . . EQQAPAYTKS ELTKPVVYQVFTRLFGNTE TANVS WGTKEQNGVGKFADFND AALKGI	84
alpha-amylase-fuliginea	KELGITH WYTGVLHHAIVADYS DYGI S CDDPDVVKGRAGSPYAI KDYYD VNPDLAI NVTNRAGEFS CLIERTHS HGAKVLI IDI VPNHVA	174
alpha-amylase-S3431	KELGITH WYTGVLHHAIVADYS DYGI S CDDPDVVKGRAGSPYAI KDYYD VNPDLAI NVTNRAGEFS CLIERTHS HGAKVLI IDI VPNHVA	174
alpha-amylase-MelDa3	KELGITH WYTGVLHHAIVADYS DYGI S CDDPDVVKGRAGSPYAI KDYYD VNPDLAI NVTNRAGEFS CLIERTHS HGAKVLI IDI VPNHVA	174
alpha-amylase-ruthenica	KELGITH WYTGVLHHAIVADYS DFLCDDPDVVKGRAGSPYAI KDYYD VNPDLAAKPS DRLQEFEALARTHECGAKVLI IDI VPNHVA	180
Amy3809	KELGITH WYTGVLHHAIVADYS DYGI S CDDPDVVKGRAGSPYAI KDYYD VNPDLAI NVTNRAGEFS CLIERTHS HGAKVLI IDI VPNHVA	174
alpha-amylase-fuliginea	RNYCSLGKPKGVDFGACDDTS KTYDKNNFYVPGCSFOVPTSTITVYVLCGNAHPLVDGFEETPAKWTGNGARS PKPDNDWYETVKV	264
alpha-amylase-S3431	RNYCSLGKPKGVDFGACDDTS KTYDKNNFYVPGCSFOVPTSTITVYVLCGNAHPLVDGFEETPAKWTGNGARS PKPDNDWYETVKV	264
alpha-amylase-MelDa3	RNYCSLGKPKGVDFGACDDTS KTYDKNNFYVPGCSFOVPTSTITVYVLCGNAHPLVDGFEETPAKWTGNGARAPKPDNDWYETVRV	264
alpha-amylase-ruthenica	RNYCSLGKPKGVDFGACDDTS KTYDKNNFYVPGCSFOVPTSTITVYVLCGNAHPLVDGFEETPAKWTGNGARKAPKPDNDWYETIKI	270
Amy3809	RNYCSLGKPKGVDFGACDDTS KTYDKNNFYVPGCSFOVPTSTITVYVLCGNAHPLVDGFEETPAKWTGNGARS PKPDNDWYETVKV	264
alpha-amylase-fuliginea	NYGVKPDGSDYDFVLP NEYKNDYRAHYAFWQDKLP S WYKFRDI ALFWLDKGVDGFRYDAEAVPVEFWS FLNS SI KWKPDFAFLAE	354
alpha-amylase-S3431	NYGVKPDGSDYDFVLP NEYKNDYRAHYAFWQDKLP S WYKFRDI ALFWLDKGVDGFRYDAEAVPVEFWS FLNS SI KWKPDFAFLAE	354
alpha-amylase-MelDa3	NYGVKPDGSDYDFVLP KELENDYRAHYAFWQDKLP S WYKFRDI TLFWLDKGVDGFRYDAEAVPVEFWS FLNS SI KWKPDFAFLAE	354
alpha-amylase-ruthenica	NYGVKPDGSDYDFPRLPEDYANKDYRAHYCFWQDKLP S WYKFRDI TQYWLAKVDGFRYDAEAVPVEFWS FLNS SI KWKPDFAFLAE	360
Amy3809	NYGVKPDGSDYDFVLP NEYKNDYRAHYAFWQDKLP S WYKFRDI ALFWLDKGVDGFRYDAEAVPVEFWS FLNS SI KWKPDFAFLAE	354
alpha-amylase-fuliginea	VYNPKMYRAYI HQGKNDYLYDKVGFYDTLKAI MQSKQANAI FDAQQCVADI ECHVLFLENHDEQRIASPDFACKAVWGKPANVSNLI	444
alpha-amylase-S3431	VYNPKMYRAYI HQGKNDYLYDKVGFYDTLKAI MQSKQANAI FDAQQCVADI ECHVLFLENHDEQRIASPDFACKAVWGKPANVSNLI	444
alpha-amylase-MelDa3	VYNPKMYRAYI CQGGKNDYLYDKVGFYDTLKAI MQGKAANTI FAAQCVADI ECHVLFLENHDEQRIASPDFACDAWGKPANVSNLMI	444
alpha-amylase-ruthenica	VYNPSLYRPYI HQGKNDYLYDKVGFYDTLKAI IQCGQADTLAKHQEVADI ECHVLFLENHDEQRIASPDFACDANWGKPANVSNLMI	450
Amy3809	VYNPKMYRAYI HQGKNDYLYDKVGFYDTLKAI MQSKQANAI FDAQQCVADI ECHVLFLENHDEQRIASPDFACNAWGKPANVSNLMI	444
alpha-amylase-fuliginea	SRAPITLLYFCQDVGEDGSEYAGFGTTRTSI FDYI GVPAHCAWNNCKFDGANTLTKQS ALRDYKAI LSLNSLPVAVGGTNS ELSVTGS	534
alpha-amylase-S3431	SRAPITLLYFCQDVGEDGLENAGFGTTRTSI FDYI GVPAHCAWNNCKFDGANTLTKQS ALRDYKAVSLNSLPVAVGGTNS ELSVTGS	534
alpha-amylase-MelDa3	SRAPITLLYFCQDVGEDGSEYAGFGTTRTSI FDYI GVPAHCAWNNCKFDGANTLTKQS ALRDYKAI LSLNSLPVAVGGTNS ELSVTGS	534
alpha-amylase-ruthenica	CRSPITLLYFCQDVGEDGSEYAGFGTTRTSI FDYI GVPAHCAWNNCKFDGANTLTKQS ALRDYKAI LSLNSLPVAVGGTNS ELSVTGS	540
Amy3809	SRAPITLLYFCQDVGEDGSEYAGFGTTRTSI FDYI GVPAHCAWNNCKFDGANTLTKQS ALRDYKAI LSLNSLPVAVGGTNS ELSVTGS	534
alpha-amylase-fuliginea	ERIVGFTIRKLCQQLYVLSNFSEQSCTMTVNLSKVQLAGLSEYTLQDLLEQHS TEI TS GSQGATF TLTLDAFSSAVLTNRANN	618
alpha-amylase-S3431	ERIVGFTIRKLCQQLYVLSNFSEQCTMTVNLSKVQLAGLSEYTLQDLLEQHS TEI TS GSQGATF TLTLDAFSSAVLTNRANN	618
alpha-amylase-MelDa3	ERVVCFVIRKLCQCSVYVLSNFSEEPCTVLI NLTPEQANTFERNKPLHDLLEQNTVKI I TDKEVTKMLSLDAFSSAVLTNRANH	618
alpha-amylase-ruthenica	KQVVSFVRQLAQRI LVMANFAQQPQSVRI DI ASGETLLG. TEPQFDAQGI SLTTPYQGVSVVQLGSKQ. .	610
Amy3809	ERIVGFTIRKLCQQLYVLSNFSEQSCTMTVNLSKVQLAGLSEYTLQDLLEQHS TEI TS ESQGATF TLTLDAFSSAVLTNRANN	618

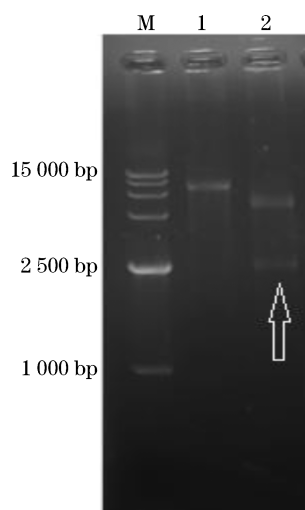
图 1 Amy3809 氨基酸序列的多重比对结果

Fig.1 Multiple sequences alignment of Amy3809 with known alpha-amylase

2.2 α -淀粉酶 Amy3809 的表达与纯化

经双酶切和测序验证后的重组质粒 *amy3809* + pET-30a 成功转化到 *E.coli* BL21.(DE3) (图 2)。SDS-PAGE 的结果表明, 0.5 mmol/L 的 IPTG 能够显著诱导重组蛋白的表达量, 且该重组酶可溶性表达的比例很高 (图 3), 同时也验证了目的基因, 成功地实现了高效异源表达。

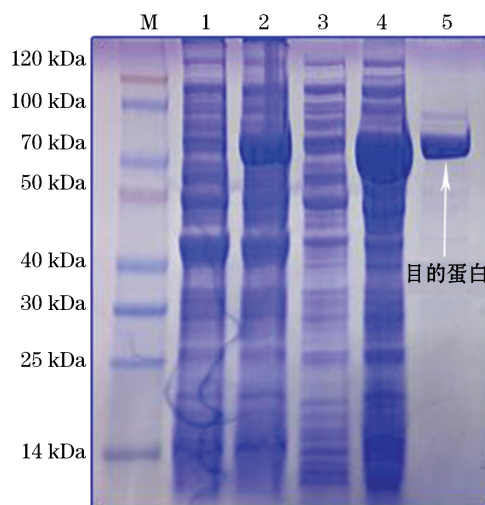
重组蛋白经镍柱纯化后可得到单一的蛋白条带, 其洗脱液中咪唑浓度为 120 mmol/L。SDS-PAGE 结果显示重组酶 Amy3809 分子量约为 70 kDa, 与推测的理论分子量一致 (67 kDa)。纯化后的 Amy3809 经标准酶活测定方法测定, 其比活力为 343 U/mg。



注: M 为核酸 marker;泳道 1 为重组质粒 amy3809+pET-30a;泳道 2 为经 BamHI/XbaI 双酶切的重组质粒 amy3809+pET-30a;箭头所指的为目的基因

图 2 重组质粒的双酶切结果

Fig.2 Double enzyme digestion of recombinant plasmids



注: M 为蛋白 marker;泳道 1 为未诱导的全细胞;泳道 2 为 16 °C 诱导 16 h 的全细胞;泳道 3 为未诱导的细胞裂解液上清;泳道 4 为 16 °C 诱导 16 h 的细胞裂解液上清;泳道 5 箭头所指为目的蛋白

图 3 Amy3809 蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of Amy3809

2.3 重组酶 Amy3809 的性质

纯化后的重组酶 Amy3809 在温度为 50 °C 时呈现最高的酶活,且在 10~40 °C 的范围内仍能保持 85% 以上的酶活,但当反应温度升高为 60 °C 时,酶活显著下降,70 °C 时几乎失活,表明该酶具有良好的低温耐受特性及热敏感性(图 4)。热稳定性实验表明,该酶在低温条件下具有较好的稳定性,当温度为 40 °C 时,保温 24 h 的条件下,仍可保持在 50% 以上的初始酶活;50 °C 保温 12 h,残留酶活仍能达到 50% 以上;当温度升高到 60 °C 时,其稳定性显著下降。与大多低温酶类似, α -淀粉酶 Amy3809 在低温下较稳定,随着温度的升高稳定性显著降低(图 5)。

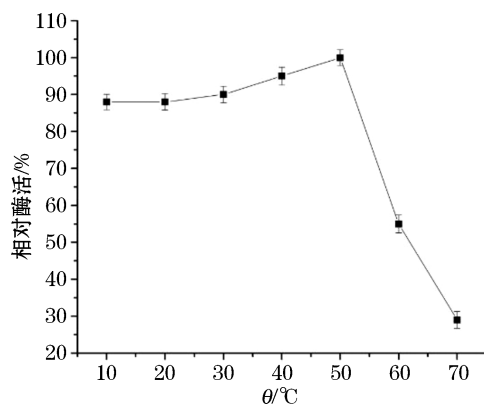


图 4 温度对重组酶 Amy3809 活性的影响

Fig.4 The effect of temperature on the activity of Amy3809

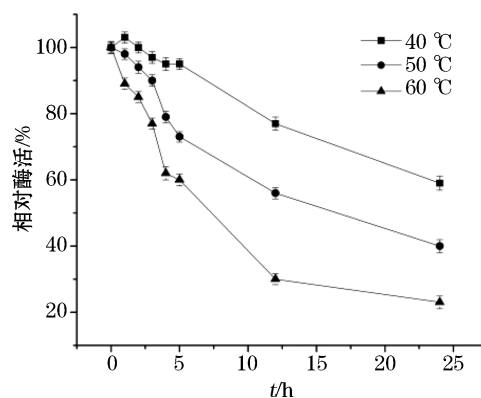


图 5 温度对重组酶 Amy3809 稳定性的影响

Fig.5 The effect of thermostability on Amy3809 at different temperatures and time points

Amy3809 具有较广的 pH 耐受范围,其最适作用 pH=7.0,但该酶在 pH 5.0~10.0 的范围内,仍保持 50% 以上的初始活性(图 6)。

金属离子对重组酶 Amy3809 的活性具有显著的影响,如图 7 所示,5 mmol/L Na^+ , K^+ , 和 Ca^{2+} 能够提高重组酶 Amy3809 的活性,但 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 和 EDTA 则显著降低 α -淀粉酶 Amy3809 的活性,尤其是 Cu^{2+} , Fe^{2+} 和 Mg^{2+} (图 7)。

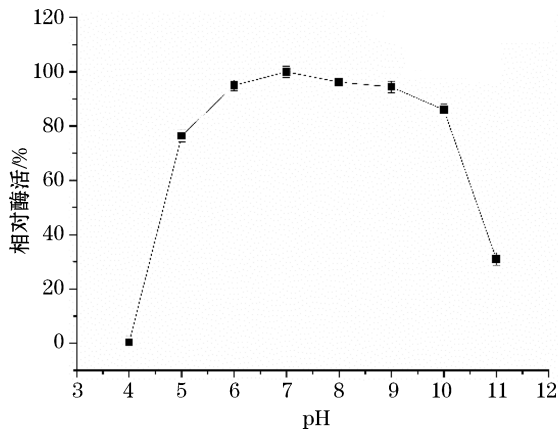


图 6 pH 对重组酶 Amy3809 活性的影响

Fig. 6 The effect of pH on the activity of Amy3809

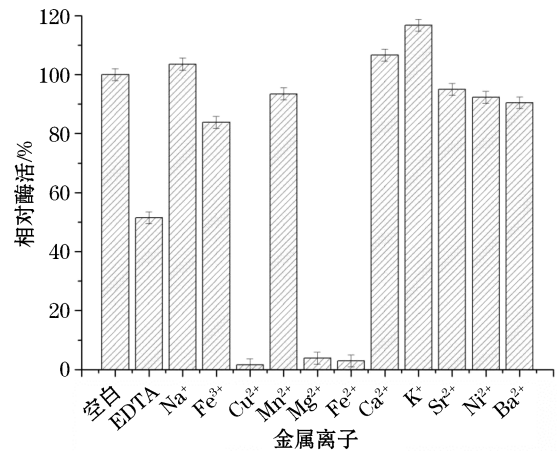


图 7 金属离子对重组酶 Amy3809 活性的影响

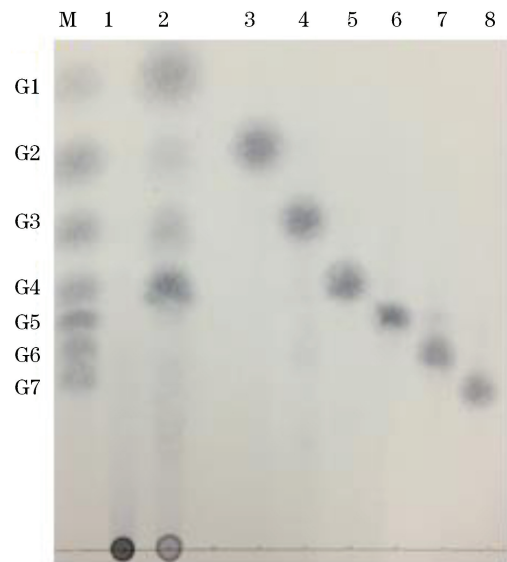
Fig. 7 The effects of metal ions and metal salts on the activity of Amy3809

2.4 酶解产物的分析

为验证重组酶 Amy3809 对可溶性淀粉的降解特性,我们采用薄层色谱(TLC)分析手段进行了分析,结果如图 8 所示。由图 8 可见,重组酶 Amy3809 能够有效地将可溶性淀粉降解为葡萄糖及不同聚合度的麦芽寡糖,其麦芽寡糖主要组成为麦芽四糖、麦芽三糖和麦芽糖。根据酶解产物的差异,可将 α -淀粉酶分为两类:糖化型 α -淀粉酶和液化型 α -淀粉酶。二者主要的差异在于,液化型 α -淀粉酶最终酶解产物为寡聚糖和糊精,而糖化型 α -淀粉酶则随着反应时间的延长,除了有寡聚糖产生外,还会有葡萄糖终产物的产生。由图 8 可见,经过 6 h 的反应,重组酶 Amy3809 的终产物中检测到大量的葡萄糖产物,因此,我们初步推测该酶为糖化型 α -淀粉酶。

3 讨论

迄今为止,已有大量淀粉酶从海水、海洋沉积物、海藻、海洋软体动物、淡水和土壤等环境微生物中分离获得,但多数已报道的淀粉酶活力低、稳定性差,无法满足工业化生产的需求^[17],因此活性高、稳定性好



注:泳道 M 为麦芽寡糖标准品;G1—G7 分别为葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖;泳道 1 为淀粉溶液;泳道 2 为 Amy3809 与淀粉反应 6 h 后的产物;泳道 3—泳道 8 分别为麦芽糖、麦芽三糖、麦芽四糖、麦芽五糖、麦芽六糖和麦芽七糖

图 8 重组酶 Amy3809 降解产物的 TLC 分析

Fig. 8 TLC of the hydrolysis products of recombinant Amy3809

的中温淀粉酶的筛选和发现仍具有重要意义。南极具有独特的自然环境^[18],因而孕育了丰富多样的生命形态,其在极端环境(如低温、高压、低营养输入、无光)下的生存机制,造就了各种具有独特生理活性的活性物质和酶系^[19-21]。本研究的 α -淀粉酶基因 *amy3809* 来自于南极适冷菌(*Pseudoalteromonas* sp.A211-5),目前有关南极微生物产淀粉酶的研究尚不多见,重组 α -淀粉酶 Amy3809 的酶学性质研究表明,该酶具有很好的低温耐受及热敏感特性、活性强、pH 适应性广,因而具有潜在的应用价值。

重组 α -淀粉酶 Amy3809 的最适作用温度为 50 °C,但随着温度的升高酶活迅速降低,70 °C 时几乎失活,表明该酶具有良好的低温耐受特性及热敏感性,据此推测此特性应该与其来源地南极生境相符。本研究结果略低于已有的中温 α -淀粉酶,如刘洋等^[16]和 Sodhi 等^[22]报道从芽孢杆菌分离的 α -淀粉酶最适反应温度为 55 °C;而 Igarash 等^[23]和黄彦超等^[24]报道的 α -淀粉酶最适反应温度为 60 °C。中温酸性的 α -淀粉酶在啤酒酿造以及淀粉糖浆行业中都具有显著的应用优势,首先,酸性淀粉酶能够与糖化酶协同作用增加淀粉的水解效率;其次,中温淀粉酶能够在较低的反应温度下进行淀粉降解,节能降耗;此外,中温淀粉酶也更容易灭活。因此,中温 α -淀粉酶的开发和应用势在必行^[25]。Amy3809 的最适 pH 为 7.0,且在 pH 在 5.0~10.0 的范围之内仍保持着较高的酶活,具有广泛的酸碱耐受性,该特性与已报到的 α -淀粉酶 AmyWQJ 以及菌株 825 产的 α -淀粉酶 pH 适应性相一致^[26-27],由于该酶具有良好的酸碱耐受性,因此具有潜在的工业生产和应用前景。

金属离子通常会对酶的活性产生影响,在研究中 Ca^{2+} , K^{+} , Na^{2+} 能够显著地提高 Amy3809 的酶活,该结果也与已有的报道相一致^[27-29],很多海洋微生物来源的酶在 Ca^{2+} 的作用下酶活能够得到提到,推测可能是因为 Ca^{2+} 与酶中的特定氨基酸的羰基形成的配位键,对于稳定酶分子的三维结构起到了重要作用,该结果也与 α -淀粉酶 Amy3809 产生菌的生境特征相符合;而 Cu^{2+} , Fe^{2+} 和 Mg^{2+} 可能是通过与 Ca^{2+} 竞争活性中心的结合位点,从而抑制其活性,而该酶确切的催化机理尚需进一步研究。

重组 α -淀粉酶 Amy3809 能够有效地将可溶性淀粉降解为麦芽四糖、麦芽三糖、麦芽糖和葡萄糖等小分子的寡糖和单糖,该结果也与已有的报道相似, α -淀粉酶 AmyWQJ 水解木薯淀粉的终产物为麦芽六糖和麦芽七糖,还有其他不同聚合度的糊精^[26]; α -淀粉酶 rBD5063 水解可溶性淀粉,随时间延长缓慢释放低聚寡糖、麦芽糖和葡萄糖,水解 17 h 后,释放大量低聚寡糖^[30]; α -淀粉酶 AmyH 水解淀粉的第 1 个明显的寡聚麦芽糖产物是麦芽三糖,最终产物为多种低聚麦芽寡糖^[31]。

鉴于 α -淀粉酶 Amy3809 低温耐受及热敏感特性,以及广泛的 pH 耐受范围,加之高效的可溶性表达,使得该酶在洗涤、食品、污水处理等行业中具有广阔的应用前景,该研究也为南极微生物资源的开发利用提供了新思路。

4 结 语

本文对来自南极 *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 的 α -淀粉酶基因 Amy3809 进行了克隆表达和酶学性质研究。结果表明,异源表达的重组 α -淀粉酶 Amy3809 的最适作用温度为 50 °C、最适作用 pH 为 7.0,且该酶具有良好的低温耐受和热敏特性以及较宽泛的 pH 适应范围;金属离子 Na^{+} , K^{+} 和 Ca^{2+} 能够激活重组 α -淀粉酶 Amy3809 的活性,而 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} 和 EDTA 则对其活性具有抑制作用;且该酶能够有效地将可溶性淀粉降解为麦芽四糖、麦芽三糖、麦芽糖和葡萄糖。综上所述, α -淀粉酶 Amy3809 具有良好的低温耐受和热敏特性以及较广的 pH 耐受范围,能够有效地将淀粉降解为低聚糖和葡萄糖,因此在工业生产中具有潜在的应用价值。

参考文献(References):

- [1] GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective[J]. Process Biochemistry, 2003,

38(11): 1599-1616.

- [2] FOSSI B T, TAVEA F, JIWOUA C, et al. Screening and phenotypic characterization of thermostable amylases producing yeasts and bacteria strains from some Cameroonian soils[J]. African Journal of Microbiology Research, 2009, 3(9): 504-514.
- [3] MAITY C, SAMANTA S, HALDER S K, et al. Isozymes of α -amylases from newly isolated *Bacillus thuringiensis*, CKB19: production from immobilized cells[J]. Biotechnology & Bioprocess Engineering, 2011, 16(2): 312-319.
- [4] PRAKASH O, JAISWAL N. Erratum to: α -amylase: an ideal representative of thermostable enzymes[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2010, 160(8): 2401-14.
- [5] WANG S, JEYASEELAN J, LIU Y, et al. Characterization and optimization of amylase production in WangLB, a high amylase-producing strain of *Bacillus*[J]. Applied Biochemistry & Biotechnology, 2016, 180(1): 1-16.
- [6] SINGH H, SONI S K. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae*, HS-3 in solid state fermentation[J]. Process Biochemistry, 2001, 37(5): 453-459.
- [7] KELLY C T, MCTIGUE M A, DOYLE E M, et al. The raw starch-degrading alkaline amylase of *Bacillus*, sp IMD 370[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15(5): 446-448.
- [8] MATSUBARA T, BEN A Y, ANINDYAWATI T, et al. Degradation of raw starch granules by alpha-amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11[J]. Journal of Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 37(4): 422-428.
- [9] MATSUBARA T, BEN A Y, ANINDYAWATI T, et al. Molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of raw starch digesting alpha-amylase from *Aspergillus awamori* KT-11[J]. Journal of Biochemistry & Molecular Biology, 2004, 37(4): 429-438.
- [10] IEFUJI H, CHINO M, KATO M, et al. Raw-starch-digesting and thermostable alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning and sequencing[J]. Biochemical Journal, 1996, 318(3): 989-996.
- [11] IEFUJI H, IIMURA Y, OBATA T. Isolation and characterization of a yeast *Cryptococcus* sp. S-2 that produces raw starch-digesting α -Amylase, xylanase, and polygalacturonase[J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2014, 58(12): 2261-2262.
- [12] XIAO C Q, QI T S, ZHAO H. Isolation of RSGA-producing strain aspergillus niger (6 #) and its enzyme producing conditions[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12(1): 76-79.
- [13] CROWE J, MASONE B S, RIBBE J. One-step purification of recombinant proteins with the 6 $\times$ His tag and Ni-NTA resin[J]. Methods Mol Biol, 1995, 4(3): 247-258.
- [14] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Biochemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [15] OKOLO B N, EZEUGU L I, MBA C N. Production of raw starch digesting amylase by *Aspergillus niger* grown on native starch sources[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 1995, 69(1): 109-115.
- [16] LIU Y, SHEN W, SHI G Y, et al. Enzymatic properties of mesophilic α -Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* M23[J]. Food Science, 2008, 29(9): 373-377. 刘洋, 沈微, 石贵阳, 等. 中温 α -淀粉酶的酶学性质研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 373-377.
- [17] YAO Q, CHEN J H. Research progress of new Type α -amylase[J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2013(6): 553-555. 姚清, 陈建华. 新型 α -淀粉酶的研究进展[J]. 药物生物技术, 2013(6): 553-555.
- [18] VINCENT W F. Microbial ecosystems of Antarctica[M]. Cambridge University Press, 2004.
- [19] SINHA R P, HADER D. UV-induced DNA damage and repair: a review[J]. Photochemical & Photobiological Sciences Official Journal of the European Photochemistry Association & the European Society for Photobiology, 2002, 1(4): 225-236.
- [20] ZHANG L, LI Y, ZHANG Z, et al. Analysis of the response of hypothetical protein gene PSYCG_10180 to temperature and salinity stress in the antarctic psychrotrophic bacterium *Psychrobacter* sp.G[J]. Advances in Marine Science, 2017, 35(4): 547-558. 张良, 李阳, 张政, 等. 南极适冷菌 *Psychrobacter* sp.G 假定蛋白基因 PSYCG_10180 对温度和盐度胁迫的应答特征分析[J]. 海洋科学进展, 2017, 35(4): 547-558.
- [21] HE P Q, LI J, LIU C Y, et al. Inhibitory effect of arctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 2018 against plant pathogenic fungi, and the study on its metabolites[J]. Advances in Marine Science, 2018, 36(1): 98-107. 何培青, 李江, 刘彩云, 等. 北极海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 抑菌活性及其代谢产物研究[J]. 海洋科学进展, 2018, 36(1): 98-107.
- [22] SODHI H K, SHARMA K, GUPTA J K, et al. Production of a thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(2): 525-534.
- [23] IGARASHI K, HATADA Y, HAGIHARA H, et al. Enzymatic properties of a novel liquefying α -amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(9): 3282-3289.
- [24] HUANG Y C, QIAN K C, PING S S, et al. Identification of a mesophilic α -amylase-producing strain isolated from the deep-sea sediment and enzymatic characteristics[J]. 2018, 39(4): 111-117. 黄彦超, 钱凯成, 平双双, 等. 一株源自深海沉积物产中温 α -淀粉酶菌株的鉴定及其酶学性质的研究[J]. 食品工业科技. 2018, 39(4): 111-117.

- [25] LIU X D, XU Y. Purification and properties of a novel acid-stable alpha amylase from *Bacillus* sp.[J]. Journal of Applied & Environmental Biology, 2008, 14(2): 235-239. 刘旭东, 徐岩. 一种新的中温酸性 α -淀粉酶的分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 235-239.
- [26] LIN Y, LIN J, WANG G Z, et al. Cloning, expression and characterization of the thermostable alpha-amylase gene from *Geobacillus* sp. WQJ-1 isolated from hot springs[J]. Journal of Fuzhou University (Natural Science Edition), 2018(1): 143-150. 林云, 林娟, 王国增, 等. 温泉源地芽孢杆菌耐热 α -淀粉酶基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2018(1): 143-150.
- [27] LIN M D, WANG G Z, YE X Y, et al. Screening of marine microorganisms produced α -amylase and it's enzymatic properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(2): 77-84. 林梦丹, 王国增, 叶秀云, 等. 产 α -淀粉酶海洋微生物的筛选及酶学性质研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(2): 77-84.
- [28] HOMAEI A, GHANBARZADEH M, MONSEF F. Biochemical features and kinetic properties of α -amylases from marine organisms [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 83: 306-314.
- [29] XUE Y, WANG M, FANG Z M, et al. Cloning and characterization of cold-active and salt-tolerant α -amylase Amy3 from *Pseudoalteromonas* sp. K8[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 336-345. 薛毅, 王梅, 方泽民, 等. 低温、嗜盐 α -淀粉酶 Amy3 的克隆、表达及重组酶性质[J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 336-345.
- [30] YUAN T Z, YAO B, LUO H Y, et al. Overexpression of one thermoacidophilic alpha-amylase gene and analysis of recombinant enzyme heterogeneity[J]. High Technology Letters, 2005, 15(11): 63-68. 袁铁铮, 姚斌, 罗会颖, 等. 一种高温酸性 α -淀粉酶基因的高效表达和表达产物分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(11): 63-68.
- [31] FANG S J. Cloning, expression, and characterization of α -amylase from *Exiguobacterium* sp. DAU5[D]. Hainan: Hainan University, 2012. 方淑君. *Exiguobacterium* sp. DAU5 α -淀粉酶基因的克隆、表达及酶学性质研究[D]. 海南: 海南大学, 2012.

Expression and Characterization of α -amylase Amy3809 From Antarctic Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. A211-5

GU Xiao-qian¹, LI Jiang¹, PAN Ai-hong², LIN Xue-zheng¹

(1. Key Laboratory of Marine Eco-Environmental Science and Technology, First Institute of Oceanography, MNR, Qingdao 266061, China;

2. Chemical Engineering Institute, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266061, China)

Abstract: The complete genome of a starch degradation bacteria *Pseudoalteromonas* sp. A211-5 from Antarctic sample was analyzed by bioinformatics methods and a putative alpha-amylase *amy3809* was screened. Expression and characterization of the putative alpha-amylase *amy3809* was investigated in this paper. The alpha-amylase *amy3809* was cloned and expressed by genetic engineering method firstly; then, the recombinant enzyme Amy3809 was purified by Ni-NTA chromatography and the characterization of recombinant Amy3809 was determined by dinitrosalicylic acid method; the hydrolysis product of recombinant Amy3809 was analyzed by thin-layer chromatography (TLC) finally. The results are listed as follows: 1) The recombinant expression vectors(pET-30a+*amy3809*) was high-efficiency expressed in *E.coli* BL21(DE3). The purified recombinant Amy3809 revealed a single band on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, with an apparent molecular weight of 67 kDa; 2) The optimum temperature of the recombinant Amy3809 was 50 °C, and it can maintain more than 85% of the initial activity between 10 °C to 40 °C, but the activity declined rapidly over 50 °C and the activity was almost completely lost when the temperature at 70 °C, the results showed that recombinant Amy3809 has good low temperature resistance properties and thermal sensitivity; 3) The optimum pH of the recombinant Amy3809 was 7.0, and it maintained as much as 50% of its maximum activity between pH 5.0~10.0; 4) Amy3809 was activated by Na⁺, K⁺ and Ca²⁺, but it was significantly inhibited by Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ and EDTA; 5) Thin-layer chromatographic analysis indicated that Amy3809 degraded soluble starch generating maltotetraose, maltotriose, maltose and glucose as the final products. The unique characteristics of Amy3809, including its low temperature resistance, thermal sensitivity, a wide range of pH tolerance, implied that this enzyme might be an interesting candidate for industrial processes.

Keyword: alpha-amylase; expression; enzymatic characterization; enzymatic hydrolysis

Received: August 1, 2018