

# 耐热异淀粉酶的高效表达及其在麦芽糖浆制备中的作用

方安然<sup>1</sup>,牛丹丹<sup>1,2\*</sup>,乔舰<sup>1</sup>,吴海洋<sup>1</sup>,董自星<sup>3</sup>,路福平<sup>1</sup>

1(天津科技大学 生物工程学院,天津,300457) 2(福州大学 生物科学与工程学院,福建 福州,350116)

3(天津科技大学 化工与材料学院生物化工系,天津,300457)

**摘要** 淀粉酶法制备高麦芽糖浆工艺中,淀粉液化酶、脱支酶以及 $\beta$ -淀粉酶不可或缺,其中脱支酶是决定淀粉转化为麦芽糖的转化率高低的关键因素。在工业上常用的两种脱支酶中,异淀粉酶比普鲁兰酶能更好地协助 $\beta$ -淀粉酶水解淀粉生成麦芽糖。首先通过PCR扩增获得异淀粉酶的编码基因*iso*并克隆入表达载体pHY-WZX,在枯草芽胞杆菌1A717中获得重组质粒pHY-ISO,将构建好的重组质粒电转入地衣芽胞杆菌D402中,其摇瓶发酵酶活力达330 U/mL,实现了异淀粉酶的异源高效表达。基本酶学特征分析表明:该重组酶适宜反应条件为50~55℃,pH 6.5~9.0; $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 对酶活有促进作用,其他离子或化合物强烈抑制酶活。HPLC分析表明,该重组异淀粉酶与普鲁兰酶相比,更有助于极高麦芽糖浆的制备。最后通过在线软件对该酶进行同源结构模拟和分析,进一步确定其为异淀粉酶,为后续对其进行分子改造奠定了基础。

**关键词** 异淀粉酶;地衣芽胞杆菌;高效表达;麦芽糖浆生产;同源结构模拟

淀粉酶法水解可以形成2种重要的糖:葡萄糖和麦芽糖,它们是淀粉生物加工与生物转化工业中主要中间产品或终产品。近年来,麦芽糖及其衍生产品在食品、医药、发酵等方面的应用已经显示出巨大的发展潜力,这些产品包括:结晶麦芽糖、麦芽糖醇、低聚异麦芽糖、海藻糖、麦芽低聚糖、环糊精等。已知工业上所使用的各类淀粉中,支链淀粉的含量占75%~85%,支链淀粉中含有4%~5%的 $\alpha$ -1,6糖苷键<sup>[1]</sup>。在上述重要淀粉衍生产品的生产中,淀粉液化酶、脱支酶以及 $\beta$ -淀粉酶不可或缺。其中,淀粉液化酶从淀粉分子内部水解 $\alpha$ -1,4糖苷键产生糊精; $\beta$ -淀粉酶从淀粉分子的次末端水解释放麦芽糖;脱支酶则是水解淀粉分子中分支点处的 $\alpha$ -1,6糖苷键,将支链淀粉水解为直链淀粉,是决定淀粉转化为麦芽糖的转化率高低的关键因素。

目前为止能够高效专一水解淀粉分子中 $\alpha$ -1,6糖苷键的酶,主要是普鲁兰酶(Pullulanase, EC 3.2.1.41)和异淀粉酶(Isoamylase, EC 3.2.1.68)<sup>[2]</sup>。除此之外,黑曲霉糖化酶具有微弱的水解淀粉 $\alpha$ -1,6糖苷键的能力<sup>[3]</sup>;细菌来源的多种寡聚 $\alpha$ -1,6葡萄糖

苷酶也具有水解 $\alpha$ -1,6键组成的寡聚葡萄糖,但水解方式不适合制糖应用目的<sup>[4]</sup>。

异淀粉酶属于淀粉脱支酶类,可专一性水解支链淀粉、糖原以及 $\beta$ -极限糊精中的 $\alpha$ -1,6糖苷键,切下整个侧链,生成直链淀粉或寡糖。已知多种淀粉水解酶与脱支酶混合使用或联合使用,可大幅度提高淀粉的水解率与利用率<sup>[5-7]</sup>。与普鲁兰酶相比,异淀粉酶可更好地协助 $\beta$ -淀粉酶水解淀粉生成麦芽糖<sup>[8]</sup>。

前期研究中,通过菌种筛选获得了多个产异淀粉酶的微生物菌株<sup>[8]</sup>,并利用分子克隆技术分离与鉴定了其中数个微生物菌株的异淀粉酶编码基因<sup>[9-10]</sup>。为此,本研究将就其中一种异淀粉酶在地衣芽胞杆菌表达系统中进行异源高表达,并评价其重组酶的基本酶学特征。在此基础上,探索异淀粉酶在淀粉酶法转化为麦芽糖中的价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与质粒

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)1A717为淀粉酶基因缺陷菌株,用于基因的克隆、重组质粒的构建与鉴定,由美国芽胞杆菌遗传保藏中心(*Bacillus Genetic Stock Center*, BGSC)惠赠。地衣芽胞杆菌D402( $\Delta amyL$ ),用于目标酶的分泌表达,为本实验室前期构建并保藏,其亲本为*B. licheniformis* CBBD302<sup>[11]</sup>。大肠杆菌JM109为本实验室保藏菌株,用于分子克隆的常规宿主细胞。表达载体pHY-WZX用于介导目的基

第一作者:硕士研究生(牛丹丹博士为通讯作者, E-mail: ddniu0529@fzu.edu.cn)。

基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年基金项目)(14JCQNJC09200);天津市高等学校科技发展基金计划项目(20130628);福建省教育厅产学研(JA15049)

收稿日期:2016-01-29,改回日期:2016-03-31

因的分泌表达,它含有地衣芽胞杆菌来源的高温 $\alpha$ -淀粉酶编码基因的启动子及其分泌信号肽序列<sup>[12]</sup>。含有异淀粉酶编码基因核苷酸序列的重组质粒 pET-ISO 由 LI 等<sup>[9]</sup>前期克隆获得。

## 1.2 主要药品与试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sma* I、*T*<sub>4</sub> DNA 连接酶、质粒小量提取试剂盒、小量 DNA 产物纯化回收试剂盒和小量 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Thermo 公司;LA *Taq* DNA 聚合酶由宝生物工程(大连)有限公司提供;肝糖原购自国药集团化学试剂有限公司;支链淀粉、淀粉糊精(DS 值:6)、普鲁兰酶、 $\beta$ -淀粉酶以及麦芽寡糖标准品购自江苏锐阳生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。寡核苷酸引物(ISO-1: 5'-CAAGGATCCATGGTGCAAGGTATC-CATGATGAAG-3'; ISO-2: 5'-GGGTTAGCTCTTTT-TAGTATAAAGCTAGTTTGTGCG-3')由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

## 1.3 培养基及配制方法

微生物常规培养用培养基为 LB 培养基,加入 2% 琼脂为固体培养基。必要时,在培养基中添加 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素或 5  $\mu$ g/mL 卡那霉素。

异淀粉酶酶活鉴定培养基(g/L):支链淀粉 2.0, 蛋白胨 5.0, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15, NaCl 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, 琼脂 18, pH 7.0。

摇瓶发酵培养基(g/L):乳糖 40, 玉米浆 30, 豆饼粉 30, 硫酸铵 5, pH 7.0。

## 1.4 常见分子克隆方法与基因扩增

质粒 DNA 的提取、酶切以及连接等按照常规实验室方法进行<sup>[13]</sup>,使用试剂盒时按照试剂盒说明书进行。大肠杆菌连接物的转化采用化学转化法<sup>[14]</sup>。PCR 反应体系组成(50  $\mu$ L):10 $\times$  PCR 缓冲液 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 上、下游引物(25 pmol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 DNA 1  $\mu$ L, LA *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, 补加超纯水至 50  $\mu$ L。PCR 扩增反应程序:95  $^{\circ}$ C 5 min;95  $^{\circ}$ C 10 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。

## 1.5 表达质粒的构建与鉴定

以纯化的 pET-ISO 质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物用 DNA 产物纯化试剂盒纯化回收,再用 *Bam*H I 酶切并纯化;将表达质粒 pHY-WZX 用 *Bam*H I 和 *Sma* I 进行双酶切并纯化回收;将上述酶切后的目的片段与质粒 DNA 按比例混合,并加入 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶进行连接。

连接物用化学转化方法<sup>[15]</sup>,转化入枯草杆菌 1A717。在含卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。对生长出的转化子进行质粒提取和限制性酶切图谱分析,将验证正确的重组表达质粒命名为 pHY-ISO。

## 1.6 重组菌的构建和遗传稳定性

按照唐雪明等<sup>[16]</sup>报道的电转化方法,将重组质粒 pHY-ISO 电击转化入地衣芽胞杆菌细胞中,涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上。37  $^{\circ}$ C 培养 18 h 后,挑取单菌落进一步在异淀粉酶酶活鉴定培养基上筛选转化子。即将转化子点接于底物平板上,过夜培养后,在平板上倒入约 10 mL 稀碘液,5 min 后观察水解圈情况,进一步经质粒提取和限制性酶切图谱分析,将验证正确的转化子命名为 *B. licheniformis* D402-ISO。

进一步对转化子的遗传稳定性进行检测,将重组菌 *B. licheniformis* D402-ISO 在 LB 培养基中进行传代和遗传稳定性检测,每 12 h 传代 1 次,共计 9 次。以每代约增殖 15 代计算,每传 1 代将菌液稀释涂布于 LB 平板,从中选取 100 个菌落对应点种于无抗生素添加的 LB 平板和含卡那霉素抗性的 LB 平板,通过计算质粒的持有率来判断重组菌的遗传稳定性。

## 1.7 摇瓶发酵及重组酶的制备

将验证正确的转化子在 250 mL 三角瓶中进行摇瓶发酵实验,具体方法如下:将转化子接种于 LB 固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 14~16 h。挑取平板上的单菌落,接种于 LB 液体种子培养基,37  $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 12~14 h。按照 10% (v/v) 的接种量接入上述转化子的培养物于发酵培养基,在 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 下发酵 120 h,每隔 24 h 取样进行酶活测定。发酵结束后,离心取上清,即为重组异淀粉酶酶液,于 -20  $^{\circ}$ C 保藏备用。

## 1.8 重组异淀粉酶的酶活测定

异淀粉酶的酶活测定按照文献方法进行<sup>[17]</sup>。一般步骤为:取 300  $\mu$ L 1% 支链淀粉溶液,加入 100  $\mu$ L 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液(pH 7.0),再加入 100  $\mu$ L 经过一定稀释的异淀粉酶酶液。50  $^{\circ}$ C 准确反应 30 min 后,吸取反应液 100  $\mu$ L,加入到含有 250  $\mu$ L 稀盐酸(0.1%)和 2.5 mL 稀碘液的 5 mL 离心管中,混合后立即测定  $A_{620\text{ nm}}$  吸光度。以未反应的酶液和底物混合物作为空白组。在上述反应条件下,每分钟所生成的直链淀粉引起 620 nm 波长下吸光度值增加 0.01,定义为 1 个酶活力单位(U)。

## 1.9 酶学性质分析

将酶液用缓冲液(醋酸钠缓冲液 pH 4.0~6.0;

磷酸缓冲液 pH 6.5 ~ 7.5; Tris-HCl pH 8.0 ~ 9.0) 稀释适当倍数, 分别在不同温度及不同 pH 条件下, 按照上述方法测定异淀粉酶的酶活力。在 pH 7.0 条件下, 分别在温度为 30、35、40、45、50、55、60、65 和 70 °C 下进行反应, 以最高酶活力为 100%, 计算其他温度下的相对酶活力, 以确定其最适反应温度; 将酶液分别在 50、55、60 和 70 °C 下保温 1 h, 每隔 15 min 取样, 冰浴 30 min 后, 测定酶活, 以未进行热处理的酶液酶活力为 100%, 计算相对酶活, 确定酶的热稳定性; 最适 pH 确定实验在 pH 4.0 ~ 9.0 的缓冲液中进行, 以最高酶活力为 100%, 计算其他作用 pH 值下的相对酶活力, 以确定酶的最适作用 pH; 在 pH 4.0 ~ 9.0 的缓冲液中, 50 °C 下保温 1 h 后, 以未进行保温处理的酶活力为 100%, 计算残余酶活力, 确定酶的 pH 稳定性; 在 50 °C, pH 7.0 (Tris-HCl 缓冲液) 条件下, 分别向酶液中加入不同金属离子或化学物质, 至终浓度为 0.5 mmol/L 或 5 mmol/L, 测定酶活力, 以未加金属离子或化学物质的原酶液的酶活力为 100%, 考察金属离子及化学物质对酶活力的影响。

### 1.10 酶解淀粉及其水解产物的 HPLC 分析

在 200 g/L 淀粉糊精 (DS 值: 6) 中按照 1.8 U/g (固含量) 添加异淀粉酶, pH 6.0, 55 °C 反应 4 h, 然后再按 0.1 °DP/g (固含量) 添加  $\beta$ -淀粉酶, 继续反应直至 24 h, 定时取样, 用 HPLC 分析麦芽糖及其相关组分的生成量。同上, 以 0.9 U/g (固含量) 普鲁兰酶替代异淀粉酶重复上述制糖实验作为对照 (普鲁兰酶的作用 pH 为 5.0, 后续  $\beta$ -淀粉酶糖化时的 pH 也为 5.0)。HPLC 分析的色谱条件是: 色谱柱为 TSK-GEL Amide-80, 流动相为 67% 的乙腈, 流速为 1 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测器为 ELSD 2000ES 蒸发光检测器。

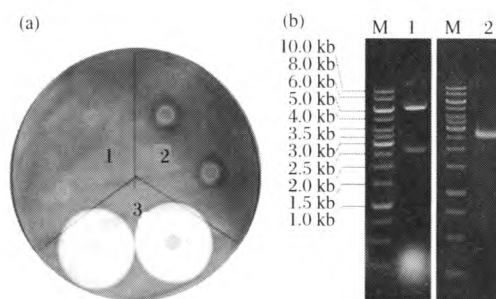
### 1.11 异淀粉酶的三级结构分析

利用在线软件 Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org>) 对异淀粉酶的三维结构进行模拟, 获得异淀粉酶的理论结构。其次, 利用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk>), UNIPROT (<http://www.uniprot.org>) 等网站获知该酶的功能结构域、活性位点、金属离子结合位点、氢键以及盐桥等信息。对于其模拟形成的蛋白结构, 利用 Pymol<sup>[18]</sup> 分析相应的氨基酸残基和氢键, 并计算相关氨基酸残基的距离等, 以获知该酶的相关性质。

## 2 结果与讨论

### 2.1 异淀粉酶重组菌的构建

通过 PCR 技术扩增出异淀粉酶成熟肽的编码基因, 酶切并克隆入表达质粒, 获得重组表达质粒 pHY-ISO, 进一步将此重组质粒用电转化方法转入菌株 *B. licheniformis* D402 中。在抗性平板上筛选转化子, 再在含有 0.2% 支链淀粉的底物平板上进行确认, 结果如图 1a 所示。在底物平板上, 转化子周围呈现深蓝色水解圈, 这是因为转化子能够合成与分泌异淀粉酶, 该酶作用于支链淀粉生成直链淀粉, 它遇碘液形成深蓝色的水解圈 (图 1a-2, 图中显示为深色水解圈)。产  $\alpha$ -淀粉酶的菌株 *B. licheniformis* CBBD302 的菌落周围经碘液染色后呈现透明水解圈 (图 1a-3)。对照菌株 *B. licheniformis* D402/pHY-WZX 则没有淀粉水解活性 (图 1a-1)。同步, 从转化子中提取重组质粒 DNA 并进行限制性酶切, 获得大小分别为 2.65 kb 和 6.7 kb 的两条带 (图 1b), 与理论值相符。以重组质粒为模板进行 PCR 扩增, 得到一条大小为 2.65 kb 的条带, 也确认转化子是正确的 (图 1b)。将此转化子命名为 *B. licheniformis* D402-ISO, 保藏并用于后续试验。



(a) 图, 1: 菌株 *B. licheniformis* D402/pHY-WZX; 2: 菌株 *B. licheniformis* D402-ISO; 3: *B. licheniformis* CBBD302。

(b) 图, M: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder;

1: 重组质粒 pHY-ISO 经 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切;

2: 异淀粉酶基因的 PCR 验证

图 1 重组地衣芽孢杆菌 D402-ISO 的验证

Fig. 1 Identification of recombinant bacterium *B. licheniformis* D402-ISO

进一步对转化子 *B. licheniformis* D402-ISO 的遗传稳定性进行检测。将重组菌 *B. licheniformis* D402-ISO 在 LB 培养基中传代和遗传稳定性检测, 每 12 h 传代 1 次, 共计 9 次。以每传代 1 次约增殖 15 代计算, 传代 6 次约 90 代后, *B. licheniformis* D402 可较稳

定携带质粒 pHY-ISO 约为 80%, 其遗传稳定性可以满足工业发酵的要求。

同时运用摇瓶发酵实验评价了菌株 *B. licheniformis* D402-ISO 的产酶水平, 结果如图 2 所示。从图 2 可以看出, 菌株 *B. licheniformis* D402-ISO 在发酵 96 h 后, 产酶水平达到最高, 为  $(330 \pm 14)$  U/mL, 较原始菌株提高了 22 倍, 是 LI 等<sup>[8]</sup>构建的异淀粉酶酶活的 1.5 倍。可见, 异淀粉酶可以在地衣芽胞杆菌表达系统中实现高表达。

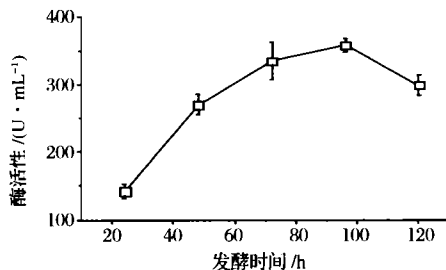


图 2 重组菌 *B. licheniformis* D402-ISO 的产酶过程

Fig. 2 The process of isoamylase production by *B. licheniformis* D402-ISO

目前, 对异淀粉酶的报道, 较多集中于菌株的筛选和生物信息学分析, 所获得的野生产酶菌株的产酶水平普遍偏低<sup>[19]</sup>, 不足 10 U/mL。但有关异淀粉酶异源高效表达的研究报道较少, 因此, 研究其高效表达具有一定的紧迫性。本文研究是对异淀粉酶异源高效表达的一种新尝试, 表达水平具有较好的指导价值。

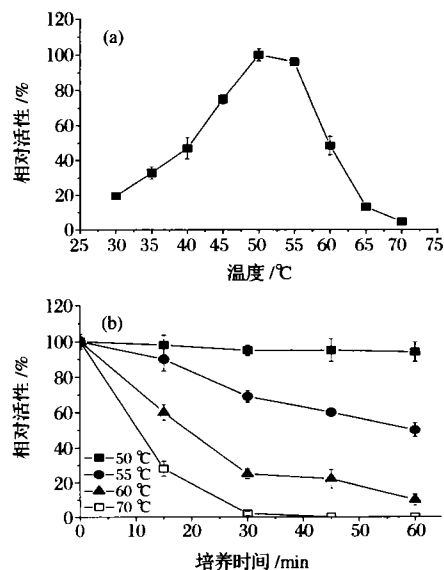
## 2.2 重组异淀粉酶的酶学性质

### 2.2.1 最适反应温度及温度稳定性

在不同温度条件下对重组 ISO 的酶活进行测定, 结果如图 3a 所示。重组酶的最适反应温度为 50 ℃, 在 45 ~ 55 ℃ 之间酶活力保持在 70% 以上。进一步将重组酶分别在 50、55、60 和 70 ℃ 条件下保温 1 h, 每隔 15 min 取样测定酶活, 确定其温度稳定性, 结果如图 3b 所示。在 50 ℃ 保温 1 h 后, 残留酶活仍保持 100%, 几乎没有损失; 在 55 ℃ 保温 30 min 后, 酶活力在 70% 以上; 而在 60 ℃、70 ℃ 处理 30 min 后, 酶活力低于 20%。

### 2.2.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 条件下测定重组酶 ISO 最适反应 pH, 结果如图 4a 所示。在 pH 7.0 下重组酶表现出最高酶活力, 且在 pH 6.5 ~ 9.0 之间, 酶活力较高保持在 90% 以上。pH 稳定性实验的结果如图 4b 所示, 在 pH 4.0 ~ 9.0 之间的缓冲液中处理 1 h 后酶活仍能保持 70% 以上; 在 pH 5.0 ~ 8.0 条件下酶活力

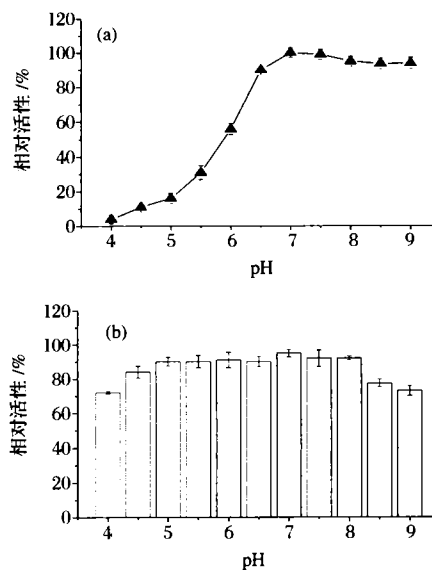


(a) 最适反应温度, 30、35、40、45、50、55、60、65 和 70 ℃; (b) 热稳定性; 误差线是标准偏差

图 3 温度对异淀粉酶的活性和稳定性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on ISO's activity and stability

保持在 90% 以上, 非常稳定。



(a) 最适反应 pH; (b) pH 稳定性; 醋酸钠缓冲液 pH 4.0 ~ 6.0; 磷酸缓冲液 pH 6.5 ~ 7.5;

Tris-HCl 缓冲液 pH 8.0 ~ 9.0; 误差线表示的是标准偏差

图 4 pH 对异淀粉酶的活性和稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH on ISO's activity and stability

HARADA 等<sup>[20]</sup>于 1968 年, 首次从细菌 *Pseudomonas amyloclavata* 中分离到异淀粉酶, 此后又进行了基因克隆与异源表达等研究, 此酶在 40 ℃, pH 3.5 ~ 4.5 下表现出最高酶活。此后也有报道从 *Aerobacter aerogenes* 和 *Enterobacter intermedia* 分离鉴定出异

淀粉酶。但由于其酶的合成水平很低,酶的最适作用温度偏低(皆低于 45 ℃),因此,除了来源于 *A. aerogenes* 的异淀粉酶有少量试验用产品供应外,未见规模化生产与应用。本研究的异淀粉酶具有良好的耐热性能,其酶学性能可以满足与中温 $\alpha$ -淀粉酶或 $\beta$ -淀粉酶复配。

2.2.3 不同金属离子及化学物质对重组异淀粉酶 ISO 活性影响

不同金属离子和化学物质对异淀粉酶酶活的影响如表 1 所示。 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活力有微弱促进作用,其他金属离子则显著抑制酶活力。其中,0.5 mmol/L 的 EDTA 可以使酶几乎失活。

表 1 金属离子及化学物质对酶活性影响

Table 1 Effect of metal ions and chemicals on enzyme activity

金属离子及 化学物质	酶的相对活性/%	
	0.5 mmol/L	5 mmol/L
对照	100.5 ± 2.10	100.8 ± 2.00
Li <sup>+</sup>	102.8 ± 1.82	103.1 ± 1.78
Na <sup>+</sup>	101.3 ± 4.17	101.4 ± 1.40
K <sup>+</sup>	106.0 ± 2.11	107.3 ± 1.21
Mg <sup>2+</sup>	103.0 ± 2.22	108.6 ± 3.55
Ca <sup>2+</sup>	111.4 ± 2.02	101.4 ± 1.02
Mn <sup>2+</sup>	88.2 ± 3.00	16.7 ± 2.21
Co <sup>2+</sup>	32.6 ± 0.91	—
Cu <sup>2+</sup>	—	—
Hg <sup>2+</sup>	—	—
Zn <sup>2+</sup>	48.0 ± 3.03	—
Fe <sup>3+</sup>	32.2 ± 2.72	—
EDTA	—	—
柠檬酸盐	101.0 ± 2.35	102.1 ± 2.16

注:“—”表示未检测到酶活力。

2.3 异淀粉酶在淀粉制麦芽糖中的作用

为了确定异淀粉酶在淀粉制糖中的作用,采用 20% 淀粉进行制糖实验,并用 HPLC 进行糖谱分析,结果汇总于表 2。在异淀粉酶的协助下, $\beta$ -淀粉酶催化水解淀粉生产的麦芽糖浆中,麦芽糖百分占比达到 94% 以上,较使用普鲁兰酶协助水解淀粉生成的麦芽糖高出 10% 左右。可以看出,异淀粉酶具有更好的协助 $\beta$ -淀粉酶水解淀粉糊精生成麦芽糖的作用。

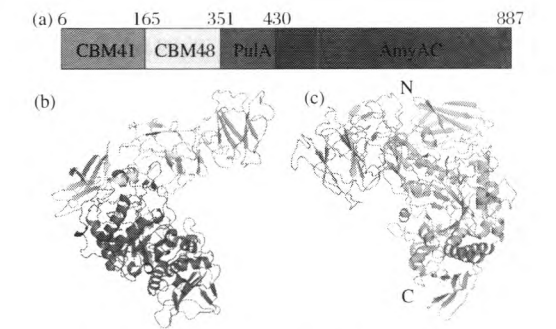
表 2 异淀粉酶在淀粉麦芽糖浆制备中的作用

Table 2 Effect of isoamylase on the preparation of maltose syrup from starch

脱支酶	糖含量/%			
	DP1	DP2	DP3	DP4
异淀粉酶	0	94.16 ± 3.28	4.76 ± 0.23	1.08 ± 0.18
普鲁兰酶	1.17 ± 0.19	85.17 ± 4.83	9.17 ± 1.32	4.49 ± 0.35

2.4 异淀粉酶的 3D 结构模拟与分析

利用在线软件 Swiss Model 对异淀粉酶的 3D 结构进行同源模拟。所用的模板为 Amylopullulanase (PDB ID: 2ya1A),二者的氨基酸序列同源性(Seq Similarity)为 35%。所建模型的估计绝对模型质量(QMEAN 4 Z-Score)为 -8.60,3D 结构见图 5。由于现有参照模型的限制,如下分析是在设定模型置信情况下进行的。



(a) 异淀粉酶的功能结构域的模块化示意图;  
(b) 异淀粉酶的三维结构模拟图;(c) 异淀粉酶的 4 个保守结构域

图 5 异淀粉酶的三维结构模拟

Fig. 5 Three dimension modeled structure of isoamylase

如图 5a 所示,异淀粉酶的三维结构由 4 个功能结构域组成。结构域 CBM41(6 ~ 165 aa)常见于淀粉分支酶中,位于蛋白质结构的 N 端,且其尾端包含 $\alpha$ -淀粉酶的活性位点;CBM48(166 ~ 351 aa)常见于异淀粉酶、普鲁兰酶和淀粉分支酶中,其包含 7 个保守的芳香族残基 (Phe285, Trp288, Tyr300, Trp321, Tyr334, Tyr336 和 Tyr351),这些残基可能与底物的结合有关;PulA(352 ~ 430 aa)常见于普鲁兰酶中,其不包含保守区域。AmyAC(431 ~ 887 aa)属于 GH13,包含 $\alpha$ -淀粉酶催化活性的区域、一个 $\text{Ca}^{2+}$ 结合区域和异淀粉酶的活性位点,其 C 端尾部存在肽段 (Val777 ~ Ala886),这段区域的功能暂时未知<sup>[21-22]</sup>。在异淀粉酶的三维结构中,这 4 个结构域的空间位置关系如图 5b 所示,从 N 端到 C 端依次标注(与图 5a 相对应),其中 N 端和 C 端两个区域由 1 条短的多肽链连接。图 5c 所示为淀粉酶系所拥有的 4 个高度保守结构域,它们分别对应于 MacGregor 等<sup>[23]</sup>在 2001 年提出的 $\alpha$ -淀粉酶的 4 个高度保守的结构域 I、II、III 和 IV。通过对本异淀粉酶的同源结构模拟,发现其具有 $\alpha$ -淀粉酶家族的相关特性,同时具有异淀粉酶的保守氨基酸残基,推测其属于一种异淀粉酶。这部分信息将为后续对此酶实施分子改造与定向进化奠

定基础。

### 3 结论

通过异源表达研究,实现了异淀粉酶以地衣芽孢杆菌为宿主细胞的高效表达,所表达的酶分子呈现的酶学特征可以在麦芽糖制造中发挥重要作用,借此有助于淀粉制造麦芽糖技术水平的提升。

#### 参 考 文 献

- [1] LEEMAN A M, KARLSSON M E, ELIASSON A C, et al. Resistant starch formation in temperature treated potato starches varying in amylose/amylopectin ratio[J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 65(3): 306–313.
- [2] BEATTY M K, RAHMAN A, CAO H P, et al. Purification and molecular genetic characterization of ZPU1, a pullulanase-type starch-debranching enzyme from maize[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 255–266.
- [3] BAGHERI A, KHODARAHMI R, MOSTAFAIE A. Purification and biochemical characterisation of glucoamylase from a newly isolated *Aspergillus niger*; relation to starch processing[J]. Food Chemistry, 2014, 161: 270–278.
- [4] WATANABE K, KITAMURA K, SUZUKI Y. Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 2066–2073.
- [5] SHAW J F, SHEU J R. Production of high-maltose syrup and high-protein flour from rice by an enzymatic method[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(7): 1071–1073.
- [6] MA Yih-er, LIN Long-liu, CHIEN H R, et al. Efficient utilization of starch by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2000, 31(1): 55–59.
- [7] 邹东恢, 侯美玉. 啤酒专用糖浆的研究与应用[J]. 食品工业, 2005(4): 9–11.
- [8] 李由然. *Bacillus lentus* CICIM304 异淀粉酶的基因克隆、鉴定与表达[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- [9] LI You-ran, NIU Dan-dan, ZHANG Liang, et al. Purification, characterization and cloning of a thermotolerant isoamylase produced from *Bacillus* sp. CICIM 304[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(5): 437–446.
- [10] LI You-ran, ZHANG Liang, DING Zhong-yang, et al. Constitutive expression of a novel isoamylase from *Bacillus lentus* in *Pichia pastoris* for starch processing[J]. Process Biochemistry, 2013, 48: 1303–1310.
- [11] 范如意, 牛丹丹, 应喜娟等. 中温  $\alpha$ -淀粉酶在地衣芽孢杆菌中的异源表达[J]. 工业微生物, 2015, 45(2): 47–54.
- [12] NIU Dan-dan, WANG Zheng-xiang. Development of a pair of bifunctional expression vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus licheniformis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(5): 357–362.
- [13] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [14] HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids[J]. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 557–580.
- [15] BOTT K F, WILSON G A. Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system[J]. Journal of Bacteriology, 1967, 94(3): 562–570.
- [16] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的诱导形成及其高效电转化方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(5): 460–463.
- [17] KROHN B M, BARRY G F, KISHORE G M. An isoamylase with neutral pH optimum from a *Flavobacterium* species: cloning, characterization and expression of the *iam* gene[J]. Molecular and General Genetics, 1997, 254(5): 469–478.
- [18] DELANO W L. The PyMOL molecular graphics system[J]. Citeulike, 2002.
- [19] 郭宏文, 江洁. 异淀粉酶产生菌的筛选[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 18–21.
- [20] HARADA T, YOKOBAYASHI K, MISAKI A. Formation of isoamylase by *Pseudomonas*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1968, 16(10): 1439–1444.
- [21] KURIKI T, IMANAKA T. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(5): 557–565.
- [22] KATSUYA Y, MEZAKI Y, KUBOTA M, et al. Three-dimensional structure of *Pseudomonas* isoamylase at 2.2 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1998, 281(5): 885–897.
- [23] MACGREGOR E A, JANEČEK Š, SVENSSON B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes[J]. Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001, 1546(1): 1–20.



## Overexpression of thermotolerant isoamylase and its application in maltose syrup preparation

FANG An-ran<sup>1</sup>, NIU Dan-dan<sup>1,2\*</sup>, QIAO Jian<sup>1</sup>,  
WU Hai-yang<sup>1</sup>, DONG Zi-xing<sup>3</sup>, LU Fu-ping<sup>1</sup>

1 (College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

2 (College of Biological Science and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou 350116, China)

3 (College of Chemical Engineering and Materials Science, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**ABSTRACT** In enzymatic preparation of high maltose syrup from starch,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase and starch debranching enzyme are indispensable. Among them, debranching enzyme is a key factor which determines the conversion rate of starch to maltose syrup. Of the two commonly used debranching enzymes in the industry, isoamylase is better than pullulanase in assisting  $\beta$ -amylase to hydrolyze starch into maltose. In this study, gene iso encoding isoamylase was amplified by PCR, cloned into expression vector pHY-WZX and chemically transformed into *Bacillus subtilis* 1A717. The recombinant plasmid was subsequently electro-transformed into *B. licheniformis* D402. At the shake-flask level, the activity of isoamylase in the recombinant bacterium reached its maximum of 330 U/mL, suggesting its heterologous overexpression. By investigating the biochemical properties of the enzyme, its optimal reaction conditions were determined to be 50–55 °C and pH 6.5–9.0.  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  could enhance the enzyme activity, while other metal ions or chemicals strongly inhibited its activity. As analyzed by HPLC, the recombinant isoamylase was better than pullulanase in preparing high-purity maltose syrup. Finally, the 3D structure of this enzyme was constructed and analyzed by online software, which further confirmed that this enzyme was an isoamylase and provided valuable information for its molecular modification in the future.

**Key words** isoamylase; *Bacillus licheniformis*; overexpression; maltose syrup preparation; homology modeling