

耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因在大肠杆菌中的表达及酶学性质研究*

刘逸寒, 李 玉, 路福平, 杜连祥

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津, 300222)

摘 要 利用表达载体 pET-30a, 实现了去信号肽的耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因 *amyd* 及未突变的高温 α -淀粉酶基因 *amy* 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的高效表达。经多步纯化, 重组酶 AMY 及 AMYD 的比活分别达到 312.7U/mg 蛋白和 354.6U/mg 蛋白, 纯化倍数分别为 75.90 和 83.83, 获得凝胶电泳条带单一的蛋白样品, 经 SDS-PAGE 检测, AMY 及 AMYD 酶分子质量均为 63.5ku。重组酶 AMY 的最适温度 80℃, 最适反应 pH 为 6.5, 在温度低于 90℃, 反应 pH5.5~7 时, 酶活较稳定。重组酶 AMYD 的最适温度 80℃, 最适反应 pH 为 4.5, 在温度低于 90℃, 反应 pH4.0~6.5 时, 酶活较稳定。

关键词 耐酸性高温 α -淀粉酶, 基因克隆, 表达, 纯化, 酶学性质

耐高温 α -淀粉酶是食品工业中应用最普遍的酶种之一, 广泛应用于啤酒、酒精、味精及淀粉工业等领域^[1]。其适用 pH 值范围为 6~7, 在酸性条件下其酶活明显降低, 很难适应我国酒精、淀粉糖等淀粉深加工行业工艺的要求。为了给淀粉原料的深加工提供更好的条件, 开创新的酶法工艺, 提高收得率、降低消耗、提高产品的质量、增加效益, 特别是为了节约工业用粮, 需要对耐高温生产菌株进行改造^[2,3], 使其能产生耐酸的高温 α -淀粉酶。

1990 年代, 中科院微生物研究所的科研人员研究了嗜热真菌 *Thermomyces lanuginosus* 对 α -淀粉酶的生产^[4], 该酶的最适温度和 pH 分别为 65℃ 和 5.0, 但其耐热性较差。2002 年 Richardson^[5] 将嗜热球菌 *Thermococcus* sp.) α -淀粉酶基因 BD5063, 在荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescen*) 中进行表达, 表达出的 α -淀粉酶最适反应 pH 值为 5.0, 最适温度为 105~110℃, 具有耐高温特性, 但是该酶的酶活较低, 不适于工业化生产。蔡恒^[6] 等人将地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因进行体外耐酸性改造后, 以 *sacB* 基因的启动子和信号肽序列为基础, 构建了诱导型表达载体, 并将其转入枯草芽孢杆菌 DB104 中, 实现了耐高温 α -淀粉酶突变基因的分泌表达, 但对该酶的性质没有进行具体的研究。

实验中尝试利用大肠杆菌高效表达系统, 对经过改造的耐高温 α -淀粉酶基因与原始耐高温 α -淀粉酶

基因进行表达, 以提高其酶活力, 研究纯化后重组酶的酶学性质, 并进行重组酶的应用试验, 为下一步实现耐酸性高温 α -淀粉酶的同源高效表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3), 克隆/表达载体 pET-30a, 均为本实验室保存。质粒 pUAM 为 pUC19 上克隆有 1.9kb 带有自身信号肽的地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因的重组载体。质粒 pUAMT 为 pUC19 上克隆有 1.9kb 带有自身信号肽的地衣芽孢杆菌耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因(成熟肽 134 位的 L-亮氨酸变为 L-精氨酸, 320 位的 L-丝氨酸变为 L-丙氨酸, 其他序列同耐高温 α -淀粉酶基因)重组载体, 均由本实验室构建。菌株培养均用 LB 液体培养基。筛选培养基是含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂培养基。

1.2 工具酶和试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 分子量标准和纯化 DNA 片段的琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 Takara 公司, 卡那霉素、T4 DNA 连接酶、蛋白质分子量标准等均购自上海生物工程有限公司, 引物合成及测序由上海 invitrogen 生物公司完成。

1.3 DNA 的提取及操作

质粒的快速提取及检测以及 DNA 的酶切、连接、大肠杆菌感受态的制备及转化按文献^[7]所述方法进行。

1.4 PCR 扩增及重组质粒构建

根据地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因及耐酸

第一作者: 硕士研究生(路福平教授为通讯作者)。

* 天津市科技攻关重点培育项目

收稿日期: 2006-08-28, 改回日期: 2006-10-18

性高温 α -酶突变基因, 去除其自身信号肽, 设计引物, 利用 PCR 得到其成熟肽序列, 上游引物 P1: 5'-CATGCCATGGCTGCAAATCTTAATGG-GACGCT-3' (下划线部分为 Nco I 酶切位点), 下游引物 P2: 5'-CCCAAGCTTCCTGAGGGCTGAT-GACACTT-3' (下划线部分为 Hind III 酶切位点)。分别以质粒 pUAM 和 pUAMT 为模板扩增 *amy* 基因和 *amyd* 基因。将 PCR 产物及提取的质粒 pET-30a, 分别用 Nco I 和 Hind III 进行双酶切, 酶切产物经纯化回收后, 用 T4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜, 电转化大肠杆菌 JM109 中, 卡那霉素抗性平板筛选转化子, 分别用 PCR 和双酶切法进行鉴定, 并挑取阳性转化子进行测序。再将阳性转化子的质粒转入表达宿主菌 BL21(DE3) 中诱导表达。

1.5 目的蛋白的诱导表达及重组菌株的稳定性分析

将构建好的工程菌株 BL21/pET-*amy* 及 BL21/pET-*amyd* 和对照菌 BL21/pET-30a 分别接种于 2 mL 的 LB 液体培养基中, 37℃ 水浴振荡培养过夜, 按 1% 的接种量转接于装有 30 mL 培养基的 250 mL 的三角瓶中继续培养 3.5 h, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 30℃ 诱导表达^[8]。4h 后, 4 000 r/min 冷冻离心收集菌体, 将菌体悬于 pH6.0 的磷酸缓冲液中, 冰浴超声。超声波功率为 400W, 超声 10 次, 每次 10s, 间隔 2min。12 000 r/min 离心破碎液, 分别取上清和沉淀用于 SDS-PAGE (分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%), 检测蛋白的表达情况。参考文献[9]中的方法, 对重组菌株的稳定性进行分析。

1.6 蛋白含量的测定

Folin-酚法: 以牛血清白蛋白为标准品作标准曲线, 样品适当稀释后在 640 nm 下得到的光吸收值查标准曲线, 得出蛋白含量。

1.7 酶活检测

α -淀粉酶活性单位(U) 的定义: 在 70℃、pH5.0 的条件下, 每分钟液化 1mg 可溶性淀粉产生的糊精所需的酶量为 1 个酶活性单位。测定方法和其他溶液的配制参照中华人民共和国行业标准 QB/T2306-97“耐高温 α -淀粉酶制剂”。酶活计算按下式进行

$$X = c \times n \times 16.67$$

式中: X —样品的酶活力, U/mL (U/g); c —测试酶的浓度, u/mL; n —样品的稀释倍数; 16.67: 换算系数。

1.8 重组酶的分离纯化

1.8.1 盐析

收集工程菌 BL21/pET-*amy* 及 BL21/pET-*amyd* 的超声破碎上清液, 分成 15 份, 每份 (50mL) 加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别至 20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 饱和度, 4℃ 静置过夜, 6 000 r/min 离心 20min, 蛋白沉淀用适量生理盐水溶解, 分别测定沉淀和上清的酶活, 绘制 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析曲线, 根据盐析曲线进行 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分步盐析制备粗酶沉淀。

1.8.2 DEAE-Sepharose Fast Flow (2.4cm×30cm) 离子交换层析

用 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液平衡层析柱, 将盐析脱盐后得到的活性组分用同样的缓冲液溶解, 6 000 r/min 离心 10 min, 上样 (2 mL) 后用同样的缓冲液先洗脱未吸附的蛋白, 再用含 0~1 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH 7.6) 缓冲液梯度洗脱, 分步收集, 测定 280 nm 吸光值和酶活力。

1.8.3 Sephadex G-75 (1.6 cm×80 cm) 凝胶层析

离子交换得到的活性组分先用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.02 mol/L Tris-HCl (pH7.6) 缓冲液平衡, 样品 6000 r/min 离心 10 min, 上样 (2 mL) 后用相同的缓冲液以 0.5 mL/min 的速度洗脱, 每管收集 2.0 mL, 紫外检测器在线检测 A280 nm, 收集活性峰。

1.9 重组酶的温度和 pH 稳定性分析

1.9.1 温度对酶活力的影响

(1) 纯酶最适反应温度的测定: 在不同温度 (30、40、50、60、70、80、90、100℃) 下测定重组酶纯酶液的酶活, 将最高活力定为 100%。

(2) 纯酶的热稳定性测定: 将 2 种重组酶纯酶液分别置不同温度 (40、60、80、100℃) 条件下保温 2h, 每隔 20min 取出, 各自测定其残余酶活力, 以未保温的酶液活力为 100%, 绘制温度稳定性曲线。

1.9.2 pH 对酶活力的影响

(1) 纯酶最适反应 pH 的测定: 在不同 pH 值 (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 下测定重组酶纯酶液的酶活, 将最高活力定为 100%。

(2) 纯酶的 pH 稳定性测定: 将 2 种重组酶纯酶液在不同 pH (3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 条件下 70℃ 保温 60 min, 各自测定其残余酶活

力,以未处理的酶液活力为 100%,绘制 pH 稳定性曲线。

1.10 重组酶应用实验

1.10.1 DE 值的测定与计算

测定方法和其他溶液的配制参照中华人民共和国行业标准 QB1216-91 中 6.6.2 直接滴定法。DE 计算按下式进行

$$DE = (1 \times V_1 \times 10) / (V_2 \times m \times G)$$

式中: DE —样品的 DE 值,%; V_1 —标定时消耗葡萄糖标准溶液(1g/L); V_2 —测定时消耗试样的体积, mL; m —样品的质量, g; G —样品的固形物含量。

1.10.2 透光率的测定

玉米淀粉液化反应结束,立即加入一定量的 1 mol/L 盐酸终止反应,并冷却至室温,以蒸馏水做对照,测定 640 nm 波长下的透光率。

1.10.3 玉米淀粉水解试验

配置浓度为 20% 的玉米淀粉溶液 100 mL,调节 pH 值至 4.5,按 30 U/g 淀粉加入重组酶,95℃ 保温 90 min 后,加入 HCl 调 pH 至 2.0,使酶钝化,终止酶的反应,并冷却至常温,钝化后加入相应的 NaOH 中和 HCl 进行 DE 值测定。

2 结果与分析

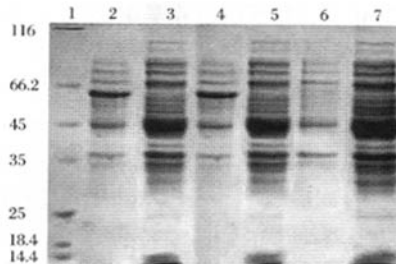
2.1 重组菌的筛选与鉴定

以提取的质粒 pUAM 及 pUAMT 为模板,利用 PCR 扩增出的基因片断为 1 568bp,大小与报道相符。将目的基因与 *Nco* I—*Hind* III 线性化的质粒 pET-30a 连接,构建重组质粒 pET-*amy* 及 pET-*amyd*。将构建的重组质粒 pET-*amy* 及 pET-*amyd* 转化大肠杆菌 JM109,在含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上挑取阳性转化子,提取质粒分别用

Nco I 和 *Nco* I—*Hind* III 进行单酶切和双酶切验证,电泳检测结果(图 1)表明重组子质粒中已带有目的基因 *amy* 及 *amyd*。对目的片段进行序列测定,结果表明,*amyd* 成熟肽与 *amy* 相比,134 位的 L-亮氨酸变为 L-精氨酸,320 位的 L-丝氨酸变为 L-丙氨酸,突变位点仍完全正确。

2.2 AMY 与 AMYD 的诱导表达

将验证正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,进行诱导表达,分别对超声破碎后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析(图 2),表达出的目的蛋白分子量为 63 000 ku,大小与报道^[10]的一致,表达量占细胞总蛋白的 17% 左右,且目的蛋白都集中在超声破碎后的上清液中,说明 AMY 和 AMYD 在大肠杆菌中并没有形成包涵体。重组菌株的稳定性试验结果表明,连续传代 60 代后,基因序列没有缺失,且 AMY 和 AMYD 的表达量无明显变化;重组质粒在无选择压力的条件下,传代 60 代后,才开始出现质粒丢失现象,说明重组菌株具有很好遗传稳定性。

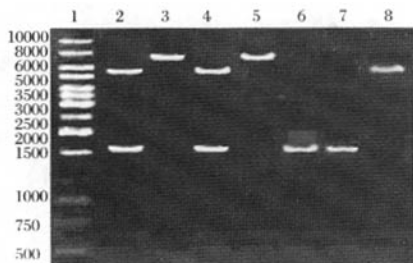


1—蛋白分子量标准,2—BL21/pET-*amy* 重组菌株破碎后上清,3—BL21/pET-*amy* 重组菌株破碎后沉淀,4—BL21/pET-*amyd* 重组菌株破碎后上清,5—BL21/pET-*amyd* 重组菌株破碎后沉淀,6—BL21/pET-30a 对照菌株破碎后上清,7—BL21/pET-30a 对照菌株破碎后沉淀

图2 各组分蛋白分析图

2.3 重组酶的分离纯化

收集工程菌 BL21/pET-*amy* 及 BL21/pET-*amyd* 超声破碎上清液各 100 mL,经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、DEAE-Sephacrose Fast Flow(2.4 cm×30 cm)离子交换层析、Sephadex G-75(1.6 cm×80 cm)凝胶层析,进行纯化。通过对重组酶整个提纯工艺各纯化步骤的总蛋白、总酶活、比活、纯度及回收率等指标的跟踪测定,得到 100 mL 重组酶破碎上清液的纯化表,如表 1 和表 2 所示。重组酶 AMY 破碎上清液经分离纯化后,纯度提高了 75.90 倍,回收率为 39.25%。重组酶 AMYD 破碎上清液经分离纯化步骤,纯度提高了 83.83 倍,回收率为 51.00%。重组酶 AMY 及 AMYD



1—1 kb DNA ladder,2—*amy*/*Nco* I Δ III,3—pET-*amy*/*Nco* I,4—pET-*amyd*/*Nco* I + *Hin* d III,5—pET-*amyd*/*Nco* I,6—*amy* 基因,7. *amyd* 基因,8—pET-30a/*Nco* I

图1 pET-*amy* 及 pET-*amyd* 重组质粒酶切图

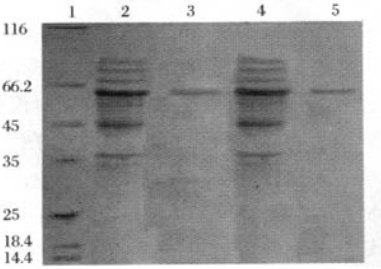
的粗酶液经纯化后,得到分子量为 63.5ku 的单一电泳条带(图 3),目的蛋白纯度大 90%。

表 1 重组酶 AMY 纯化表

步骤	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活 /U · mg ⁻¹	回收率 /%	纯化倍数
上清液	2597.09	10700	4.12	100	1.0
盐析	223.04	9100	40.8	85.05	9.90
离子交换层析	30.57	6500	212.6	60.75	51.60
凝胶层析	13.43	4200	312.7	39.25	75.90

表 2 重组酶 AMYD 纯化表

步骤	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活 [*] /U · mg ⁻¹	回收率 /%	纯化倍数
上清液	2581.56	10920	4.23	100	1.0
盐析	214.03	8950	41.7	81.96	9.86
离子交换层析	30.81	7130	231.4	65.29	54.70
凝胶层析	15.70	5570	354.6	51.00	83.83



1— 蛋白分子量标准,2— BL21/pET— amy 重组菌株破碎后上清,3— 纯化后的重组酶 AMY 活性组分,4— BL21/pET— amy d 重组菌株破碎后上清,5. 纯化后的重组酶 AMYD 活性组分

图 3 工程菌表达产物纯化的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

2.4 重组酶的稳定性分析

2.4.1 酶的热稳定性

AMY 及 AMYD2 种酶反应的最适温度均为 80℃,在 70~90℃之间相对酶活为 90%以上。分别对 AMY 和 AMYD 的热稳定性进行分析,结果表明在 40℃到 80℃保温 120 min,酶活基本没有损失,残余酶活均能保持在 80%以上(图 4 和图 5)。在 100℃保温 60 min,AMY 和 AMYD 仍有 51%、58%的残余酶活,表明这 2 种酶均具有较好的耐热性。

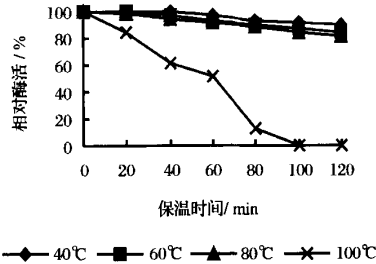


图 4 AMY 的热稳定性

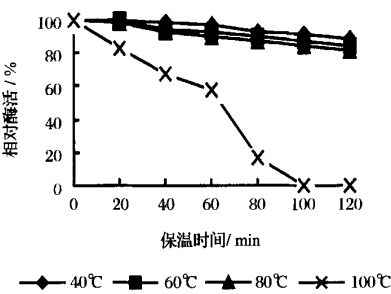


图 5 AMYD 的热稳定性

2.4.2 酶的 pH 稳定性

AMY 的最适 pH 值为 6.5,在 pH 值 6~7 之间,相对酶活在 90%以上,pH 值 3.5 以下完全失活。AMYD 最适 pH 值为 4.5,在 pH 值 4 时相对酶活仍达到 80%。分别对 AMY 和 AMYD 的 pH 稳定性进行分析,结果如图 6 所示,重组酶 AMY 在 pH 值 5.5~7.0 范围内较稳定,残余酶活在 80%以上。重组酶 AMYD 在 pH 值 4.0~6.5 范围内较稳定,残余酶活在 80%以上,pH 值 4.5 时残余酶活为 90%,说明 AMYD 具有很好的耐酸稳定性。

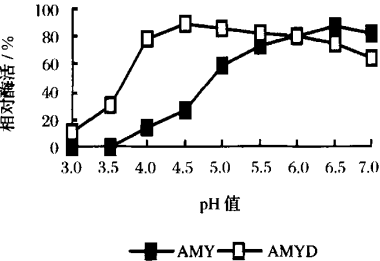


图 6 AMY 和 AMYD 的 pH 稳定性

2.5 重组酶应用实验

将 2 种重组酶应用于淀粉水解试验中,DE 值的变化结果如图 7 所示。

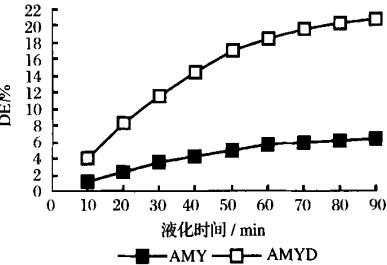


图 7 DE 值变化曲线

在 95℃,pH 值 4.5 的反应体系下,AMYD 的 DE 值明显高于 AMY。液化液的透光率可以直接反

应液化液中杂质的凝聚情况,如果杂质凝聚好,则透光率大,反之,则透光率小^[11],故选择透光率作为液化研究的另一指标。由图8所示,AMYD的透光率值高于AMY,说明在95℃,pH4.5的反应体系下,AMYD液化液中杂质凝聚的效果好于AMY液化液。这一应用试验结果表明,AMYD在高温酸性条件下的酶活力及稳定性明显高于AMY。

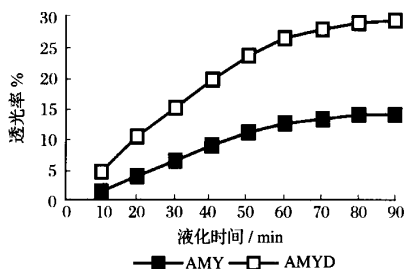


图8 透光率变化曲线

3 讨论

耐酸性高温 α -淀粉酶是酒精、味精及淀粉糖等工业淀粉液化过程中的关键酶。袁铁铮^[11]等人将一种经密码子优化的高温酸性 α -淀粉酶基因经rBD5063在巴斯德毕赤酵母中得到了高效表达,表达量达到60 mg/L。蔡恒^[6]等人构建了诱导型表达载体pBSAT在枯草芽孢杆菌蛋白酶双缺陷型突变株DB104中实现了 α -淀粉酶基因的分泌表达,经过改造的 α -淀粉酶基因的表达产物具有一定的耐酸性,但表达量不高。在本研究中,利用含有T7强启动子的pET-30a作为表达载体,以BL21(DE3)作为宿主菌,实现了去信号肽的高温 α -淀粉酶基因amy及耐酸性高温 α -淀粉酶突变基因amyd(amyd是以高温 α -淀粉酶基因amy为模板,其编码蛋白成熟肽134位的L-亮氨酸变为L-精氨酸,320位的L-丝氨酸变为L-丙氨酸的突变基因)的高效表达,AMY及AMYD的表达量分别达到121 mg/L和141 mg/L,与其他国内的相关研究报道相比,大大提高了其在异源表达体系中的表达量。

重组细胞破碎液经超滤、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、离子交换层析及凝胶层析纯化后,得到的重组酶AMY及AMYD的比活分别达到312.7 U/mg蛋白和354.6 U/mg蛋白,纯化倍数分别为75.90和83.83,获得凝胶电泳条带单一的蛋白样品,达到了工业化的生产要求。

综合诸多有关耐酸性 α -淀粉酶的报道,在毕赤

酵母中表达的 α -淀粉酶rBD5063最适pH值为5.0,且具有较好的热稳定性^[12],欧洲的研究者采用基因技术改造Bacillus licheniformis生产耐热性的耐酸性 α -淀粉酶,液化pH值可以降低到5.0,且在100℃左右保持稳定性^[4]。丹麦NOVO公司开发出的耐高温淀粉酶CS,液化pH可低至5.3。本研究中发现,AMY及AMYD的最适温度均为80℃,在40℃到80℃时保温120 min,酶活基本没有损失,100℃保温60 min,仍分别有51%、58%的残余酶活,具有较好的热稳定性,氨基酸突变位点没有影响其耐热机制。AMY及AMYD的最适pH分别为6.5及4.5,pH稳定范围分别为5.5~7.0及4.0~6.0,AMYD的酸稳定性明显高于AMY,并且AMYD的最适pH与稳定性也均好于国内外相关研究水平。在玉米淀粉水解试验中,重组酶AMY及AMYD在95℃,pH值4.5反应体系下,水解玉米淀粉90 min,结果发现,AMYD对玉米淀粉的水解能力及液化液中的杂质凝聚效果均明显好于AMY。可见AMYD在高温酸性条件下的活力稳定,水解效果良好,反应体系满足工业生产中淀粉液化过程对于温度和pH的要求。另外,通过本试验还可得出,氨基酸突变位点可能导致蛋白质的空间构象发生了变化,对耐高温 α -淀粉酶的耐酸性产生影响,获得了既耐高温又耐酸的新型 α -淀粉酶基因,这为以后应用定点突变技术等分子生物学手段改变现有某些酶的理化性质提供了可借鉴的成功先例。在本研究基础上,下一步探索将该新型突变 α -淀粉酶基因采用合适的载体导入出发菌株地衣芽孢杆菌中,实现同源表达,利用该菌株天然的优良的分泌表达系统实现突变 α -淀粉酶基因的高效表达。

参考文献

- 马福强. 耐高温 α -淀粉酶在酒精生产中的应用[J]. 酿酒科技, 2001, 5: 42~43
- Lin L L, Hsu W H, CHu W S. A gene encoding for an alpha-amylase from thermophilic *Bacillus* sp. strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. [J]. J Appl Microbiol, 1997, 82 (3): 325~334
- Jeang C L, Chen L S, Chen M Y, et al. Cloning and expression of a raw-starch digesting amylase gene from *Cytophaga* sp. in *Escherichia coli*. [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68 (7): 3 651~3 654
- 张丽苹,徐岩,金建中. 酸性 α -淀粉酶的研究与应用[J]. 酿酒, 2002, 29 (3): 19~21
- Richardson T H, Tan X, Frey G, et al. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable α -amylase[J]. J

- Biol Chem, 2002, 277(29): 26501
- 6 Cai Heng, Chen Zhongjun, Du Lianxiang, et al. Expression and secretion of an acid-stable α -amylase gene in *Bacillus subtilis* by *SacB* promoter and signal peptide[J]. Biotechnology Letters 2005, 27: 1 731~1 736
 - 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 - 8 Lin L L, Hsu W H. Lactose-induced expression of *Bacillus* sp. TS-23 amylase gene in *Escherichia coli* regulated by a T7 promoter[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 365 (1): 235~239
 - 9 史悦,于慧繁,田卓玲,等. 产腈水合酶重组大肠杆菌的质粒稳定性研究[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 70~75
 - 10 李金霞,蔡恒,路福平,等. 地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因在大肠杆菌中的克隆、表达及其产物的分泌[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 70~73
 - 11 高群玉,黄立新,黄农荣. 耐高温 α -淀粉酶作用于谷物粉液化水解性质的研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(6): 1~4
 - 12 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

Expression of the Acid-resistant and Heat-stable α -amylase Mutation Gene in *Escherichia coli* and Study on Characterization of the Enzyme

Liu Yihan, Li Yu, Lu Fuping, Du Lianxiang

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology; The College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 30022, China)

ABSTRACT In this research, the acid-resistant and heat-stable α -amylase mutation gene (*amyd*) and heat-stable α -amylase gene (*amy*) were cloned into expression vector pET-30a constituting recombination vector pET-*amyd* and pET-*amy* which were transformed into BL21(DE3). Positive transformant was cultivated and IPTG was added into culture to induce expression of the α -amylase. By multi-step purification, the specific activity of AMY and AMYD were 312.7U/mg and 357.6U/mg, they were purified to 75.90 and 83.83 folds respectively. Analysed by SDS-PAGE, the recombinant enzyme AMY and AMYD had a molecular mass of 63.5KDa. The optimum reaction temperature of AMY and AMYD were 80°C and the 80% of their maximal activity were retained below 90°C. The AMY and AMYD were optimally active at pH 6.5 and pH 4.5 and showed stability at pH range of 5.5 to 7 and 4.0 to 6.5.

Key words acid-resistant and heat-stable α -amylase mutation gene, gene clone, expression, purification, characterization of the enzyme



2007年第三届中国国际饮料工业科技展将在上海举办

近5年来,中国饮料每年以16%的增幅快速发展,特别是2006年全行业产量增长更是达到24%,展现出喜人景象。2007第三届中国国际饮料工业科技展(CBST 2007)作为协会为会员搭建的又一盛事平台将于2007年12月3~5日在上海光大展览中心西馆举办,展出面积将达到8 000m²,展会报名已全面展开。

此次展会在设立原料类、配料类、设备类、包装类、配套类、售卖类等常规展区的同时,特别设立了清洁生产展区,为环境保护、节能降耗、降低成本提供平台。

此次展会于2007年3月1日正式开始报名,有意参展的企业可上网 www.chinabeverage.org/cbst 提交报名表或与展会组委会联系。

此次展会配套众多大型行业活动,如2007中国饮料工业协会年会、技术工作委员会年会、科技报告会、果汁产业联盟成立大会、专题技术报告会等。展会的共同筹办单位还将在会议期间分别举行其全国分厂工作会议。可口可乐中国区生产技术人员、百事可乐中国区生产维修年会及其他国内饮料企业的相关活动等也将在同期举办。

《2007中国饮料供应商指南》是此次展会的指定会刊,刊登饮料配套企业资讯,为参展商及配套企业提供充足的宣传机会。此次《指南》为了方便观众查阅将采取中英文对照版式。CBST2007的有关信息将及时刊登在 www.chinabeverage.org/cbst,敬请查阅。如有意参展请联系展会组委会。

展会组委会设在中国饮料工业协会 地址:北京市阜外大街乙22号,邮编:100833,电话:010-68396521/90,传真:010-68396524/90,联系人:田杰,电子信箱: tj@chinabeverage.org