

Thermobifida fusca 葡萄糖异构酶在枯草杆菌中的表达^{*}邓辉^{1,2}, 陈存武¹, 孙传伯¹, 韦传宝^{1,2}

1(皖西学院 生物与制药工程学院, 安徽 六安, 237012)

2(六安市蛋白质分离与纯化研究中心, 安徽 六安, 237012)

摘 要 为研究葡萄糖异构酶(GIase)在枯草杆菌中的表达效果,通过PCR扩增*Thermobifida fusca* GIase基因*xylA*,分别克隆该基因序列到不同诱导表达方式的穿梭载体:pHCMC04、pMA09、pAL12,并转化枯草杆菌WB600。结果表明,含重组质粒pMA09-*xylA*的枯草杆菌产酶最优,达到1.8 U/mL。对该重组枯草杆菌发酵产酶条件进行优化,以TB为发酵培养基,初始pH 7.0,温度为30℃时,摇瓶培养24 h后,GIase的产量达到5.6 U/mL。

关键词 枯草芽孢杆菌; *Thermobifida fusca* 葡萄糖异构酶; 枯草杆菌中表达; 发酵优化

D-木糖异构酶(xylose isomerase XIase, EC 5.3.1.5)能可逆催化D-木糖和D-木酮糖之间的异构转化,也能可逆催化D-葡萄糖为D-果糖之间的异构转化,所以在食品工业中也被称为葡萄糖异构酶(GIase)^[1]。GIase是高果糖浆(high fructosesyrup, HFS)工业的关键用酶,由于高果糖浆比蔗糖更有益于健康,并有着良好的发酵性能和适宜的口感,被越来越广泛地应用在食品和饮料工业中。

为大幅提高GIase的产量和生产强度,将GIase的基因过量表达是最有效的途径之一。常用的基因工程宿主菌有大肠杆菌、枯草杆菌以及酵母^[2]。在本实验室前期工作中,一种来源于嗜热菌*Thermobifida fusca*的GIase基因*xylA*在*E. coli*中成功克隆表达,并进行了酶学性质和转化率的分析,以葡萄糖为底物该酶的 K_m 和 K_{cat} 值分别为190 mmol/L和35 s⁻¹^[3],高的催化活力、高的转化率将使该酶成为改进葡萄糖异构化食品工业过程中潜力巨大的候选者。然而大肠杆菌在过量表达外源蛋白时,易形成不溶性包涵体或聚集体,同时存在着可能对人体有害的内毒素。枯草杆菌作为一种工业中应用广泛的工程菌,在一些方面具有无可比拟的优势^[4-5]:首先,枯草杆菌是国际公认的食品安全菌株;其次,种属间的密码子偏好性不明显;最后,同大肠杆菌一样,枯草杆菌的表

达机理也已被深入研究。但关于GIase在枯草杆菌中的表达还研究较少,HUANG^[6]等把大肠杆菌的GIase基因和*Bacillus licheniformis*青霉素酶的启动子相融合,使GIase基因在*B. subtilis*成功表达,Lee^[7]等将来源于*Clostridium thermosulfurogenes*的GIase基因克隆到大肠杆菌和枯草杆菌的穿梭质粒pMG1,其表达量为1.54 U/mg,高于该酶在野生菌的表达量0.29 U/mg。虽然枯草杆菌具有强大的蛋白分泌能力,但可能是因为GIase是胞内酶,两位研究者测定的都是胞内酶活。在本实验研究中我们尝试选用不同诱导方式的枯草杆菌表达系统在胞内表达*Thermobifida fusca* GIase,并进一步研究培养基、温度和pH等条件对重组枯草杆菌发酵产酶的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

Thermobifida fusca WSH03-11菌株,克隆宿主菌:*E. coli* JM109, *B. subtilis* WB600(his-nprB-nprE18-aprE-epr-bpf-mpr),表达质粒pHCMC04、pAL12和pMA09均为本实验室保藏。pMD18-T simple购自大连宝生物工程公司。

1.2 试剂

营养琼脂、蛋白胨、酵母抽提物购自Oxoid,工具酶、基因组DNA提取试剂盒、PCR扩增试剂盒、DNA胶回收试剂盒均购自上海生工生物工程有限公司,PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 培养基

LB培养基, Amp终浓度100 μg/mL。TB:甘油5

第一作者: 博士, 副教授(韦传宝教授为通讯作者, E-mail: 491243642@qq.com)。

^{*} 国家863计划项目“糖工程关键技术与重大产品开发”(2012AA021500); 中央高校基本科研业务费专项资金(JUDCF10070)资助项目; 国家自然科学基金(面上项目, 项目号: 81274021)

收稿日期: 2015-08-04, 改回日期: 2015-09-08

g/L, 蛋白胨 12 g/L, 酵母粉 24 g/L, K_2HPO_4 16.4 g/L, KH_2PO_4 2.3 g/L。

1.4 重组质粒 pHGI、pMGI 和 pAGI 的构建

提取 *Thermobifida fusca* 的基因组 DNA, 并以此为模板 PCR 扩增 Glase 酶基因。PCR 反应条件: 94 ℃ 8 min; 94 ℃ 45 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 130 s, 循环 30 次; 72 ℃ 10 min。PCR 引物如下:

PH1(5'-3'): A/CTAGTATGAGCAACTACCAGCCACACCCG

PH2(5'-3'): G/GATCCTTAGCGCACGCCAGGAGGTAGT

PM1(5'-3'): CATATGAGCAACTACCAGCCACACCCGAG

PM2(5'-3'): G/GATCCTTAGCGCACGCCAGGAGGTAGT

PA1(5'-3'): G/GATCCATGAGCAACTACCAGCCACACCCG

PA2(5'-3'): T/CTAGATTAGCGCACGCCAGGAGGTAGT

引物对 PH1、PH2 分别含 *Spe*I 和 *Bam*H I 的限制性酶切位点(载体不含信号肽序列), 引物对 PM1、PM2 分别含 *Nde*I 和 *Bam*H I 的限制性酶切位点(去除信号肽序列 SestA)。引物对 PA1、PA2 分别含 *Bam*H I 和 *Xba*I 的限制性酶切位点(去除信号肽序列 SamyQ), 分别以引物对扩增得到 *xylA* 基因片段, 将其克隆、纯化、回收后分别插入 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pHCMC04^[8]、pMA09^[9] 和 pAL12^[10] 中, 其中, pHCMC04 的启动子为 *PxylA*, 为木糖或 IPTG 诱导表达; pMA09 的启动子为 PHpaII, 为组成性表达; pAL12 启动子为 *Pdes*, 为低温 25 ℃ 诱导表达。分别构建的重组质粒命名为 pHGI、pMGI 和 pAGI。

1.5 枯草杆菌转化及培养

枯草杆菌转化参照 Spizizen 的方法^[14]。挑取转入表达宿主 *B. subtilis* 的单克隆于 LB 培养基生长 9 h, 按体积分数为 1% 的接种量将种子发酵液接入 50 mL 发酵培养基, 在 37 ℃ 摇床培养 30 h, 其中重组菌 WB600/pHGI 在培养到 OD_{600} 值为 1.5 时, 添加 4 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, WB600/pAGI 在培养到 OD_{600} 值为 1.5 时, 降温到 25 ℃ 诱导表达, 因 WB600/pMGI 为组成性表达, 所以培养条件不作变动。每隔一段时间取样, 将发酵液于 12 000 r/min 离心 2 min, 除上清液收集菌体, 将菌体复溶后超声破壁 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 10 min, 保留上清液、悬浮沉淀待用。

1.6 分析方法

DNA 琼脂糖凝胶电泳和表达产物的 SDS-PAGE 按文献^[11]方法进行。Glase 活性的测定其异构转化葡萄糖为果糖的活性。反应体系为 1 mL, 包含 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.5), 900 mmol/L *D*-葡萄糖水溶液, 5 mmol/L $MgSO_4$ 水溶液, 0.1 mL 适当稀释的酶液。反应体系在 70 ℃ 水浴 10 min, 然后用 1 mL

0.5 mol/L $HClO_4$ 溶液终止反应。反应体系中的 *D*-果糖通过半胱氨酸-吡唑方法测定^[12]。1 个酶活力单位(U)定义为: 上述反应条件下, 1 min 内生成的 1 μ mol *D*-果糖。菌体的浓度采用分光光度法测定。实验设置 3 个重复。

1.7 重组枯草杆菌外源蛋白表达条件优化

1.7.1 不同培养基对产酶的影响

采用 6 种培养基发酵产酶, 25 h 后测定 OD_{600} 值和酶活。

1.7.2 培养温度对产酶的影响

在最佳培养基中, 分别采用 25、30、37 ℃ 培养 25 h 后测定 OD_{600} 值和酶活。

1.7.3 初始 pH 对产酶的影响

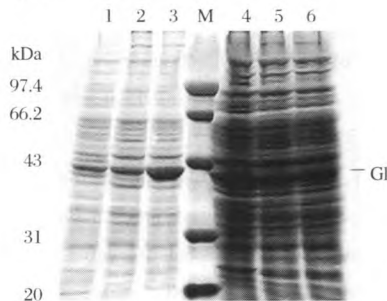
在最佳培养基和最适温度条件下, 调节初始 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 25 h 后测定 OD_{600} 值和酶活。

2 结果

2.1 重组菌 *B. subtilis* WB600/pHGI、WB600/pMGI 和 WB600/pAGI 的构建与表达

以提取的 *T. fusca* WSH03-11 的 *xylA* 基因(与 GenBank Accession No. CP000088 序列一致)片段插入 pMD18-T simple 质粒中, 分别采用相应的引物 PCR 扩增目的基因, 纯化回收目的基因后分别与同样酶切纯化回收的枯草芽孢杆菌表达载体 pHCMC04、pMA09 和 pAL12 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑取阳性克隆, 提质粒, 双酶切鉴定, 显示出 2 条明显的条带, 条带大小与预期相符, 证明 *xylA* 基因已成功连接到 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pHCMC04、pMA09 和 pAL12 中, 将重组质粒分别命名为 pHGI、pMGI 和 pAGI。将重组质粒分别转化枯草芽孢杆菌 WB600, 获得重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHGI、WB600/pMGI 和 WB600/pAGI。通过质粒提取和限制性酶切鉴定确认了重组菌构建成功。同时, 以空载转化宿主菌 WB600 为对照, 处理方式同上。将上述重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHGI、WB600/pMGI 和 WB600/pAGI 以及含空载质粒的枯草芽孢杆菌 WB600/pHCMC04、WB600/pMA09 和 WB600/pAL12 分别接入 LB 培养基中表达, 间隔一定时间取样, 测定胞内 Glase 的酶活。测得重组枯草芽孢杆菌 WB600/pHGI、WB600/pMGI 和 WB600/pAGI 破壁上清液的活力分别为 1.1、1.8 和 1.3 U/mL, 而含空载的重组枯草芽孢杆菌对照菌株均检测不到 Glase 活性。利用质量分数

为 12% 的 SDS-PAGE 对重组枯草杆菌破壁上清和破壁后沉淀进行检测,在破壁上清和破壁沉淀中均发现与 GI 酶分子量相对应的约 42 kDa 处有条带(图 1)。实验结果一方面表明构建的 3 种重组质粒在重组枯草芽孢杆菌胞内均成功表达,且 WB600/pMGI 的表达量最高;另一方面表明重组枯草芽孢杆菌产酶速度过快,导致细胞破壁沉淀中也含有目的蛋白条带,发酵过程有待进一步优化。



M - 标准蛋白; 1 - 枯草芽孢杆菌 WB600(pHGI)细胞可溶性收集物; 2 - 枯草芽孢杆菌 WB600(pAGI)细胞可溶性收集物; 3 - 枯草芽孢杆菌 WB600(pMGI)细胞可溶性收集物; 4 - 枯草芽孢杆菌(pHGI)细胞不溶性收集物; 5 - 枯草芽孢杆菌 WB600(pAGI)细胞不溶性收集物; 6 - 枯草芽孢杆菌 WB600(pMGI)细胞不溶性收集物

图 1 GIASE 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression of Glase

2.3 重组枯草杆菌外源蛋白表达条件优化

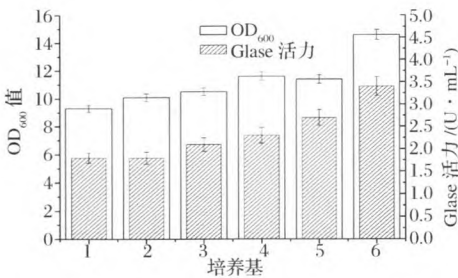
选取上述实验中表达量最高的重组菌株 WB600(pMGI)对其表达条件进行进一步优化,因该载体为本底水平表达,对其摇瓶发酵的培养基、温度和初始 pH 进行优化,并考察最优条件下摇瓶中重组 *B. subtilis* WB600(pMGI)产 GIase 的发酵过程。

2.3.1 初始培养基对产酶的影响

首先选择适合重组枯草杆菌表达 GIase 的培养基,将重组菌株置于 6 种较典型的枯草杆菌培养基中进行培养,测定 OD₆₀₀ 值和酶活,其他条件为:初始 pH 7.5,发酵温度 37 ℃,发酵时间 25 h。在这些培养基中,TB 培养基是最利于 GIase 表达的发酵培养基,发酵液中菌体的浓度最高,酶活力也最高,这可能与 pH 缓冲能力强,营养成分丰富有关。如图 2,在 TB 培养基中,发酵 25h 后胞内酶活达到 3.4 U/mL。

2.3.2 培养温度对产酶的影响

表 1 为不同温度下,菌体生长和产酶情况。其他条件为,TB 培养基、初始 pH 7.5 和发酵时间 25 h。结果表明:在 30 ℃下酶活最高,为最适发酵温度。



1 - Luria-Bertani; 2 - Luria-Bertani + 10 g/L 葡萄糖; 3 - Tryptic Soy Broth; 4 - 营养肉汤 + 10 g/L 淀粉; 5 - M9; 6 - Terrific Broth

图 2 出发培养基对菌体生长和产 Glase 酶活力的比较

Fig. 2 Effect of media on cell growth and production of Glase

表 1 温度对 GIase 发酵生产的影响

Table 1 Effect of temperature on the production of Glase

温度/℃	OD ₆₀₀ 值	Glase 活力/(U·mL ⁻¹)
25	10.1	4.3
30	12.7	5.0
35	13.9	3.8
37	14.3	3.4

2.3.3 初始 pH 对产酶的影响

表 2 为不同初始 pH 对产酶的影响。其他条件为,TB 培养基、发酵温度 30 ℃和发酵时间 25 h。结果表明:控制初始 pH 在 6.0 ~ 7.5 有利于菌株产酶,初始 pH 在 7.0 时更有利于菌体生长,在 pH 7.0 时酶活最高,说明中性环境有利于该菌体的生长和外源基因的表达。

表 2 初始 pH 对 GIase 发酵生产的影响

Table 2 Effect of initial pH on the production of Glase

初始 pH	OD ₆₀₀	Glase 活力/(U·mL ⁻¹)
5.5	11.1	2.9
6.0	12.3	4.5
6.5	13.5	5.0
7.0	14.6	5.6
7.5	14.3	5.1
8.0	12.9	3.7

2.3.4 摇瓶中重组 *B. subtilis* WB600(pMGI)产 GIase 的发酵过程

实验进一步考察了摇瓶中重组 *B. subtilis* WB600(pMGI)产 GIase 的发酵过程的菌体生长曲线和产酶曲线,以确定发酵终止时间。由图 3 可知,重组菌约在 20 h 菌体浓度达到最高,产酶量约在 24 h 达到最高,所以合适的发酵终止时间为 24 h。

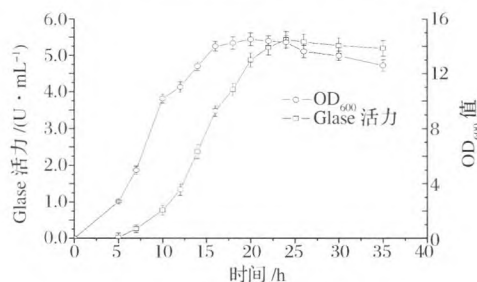


图3 摇瓶条件下重组 *B. subtilis* WB600/pMGI 产 Glase 的发酵过程

Fig. 3 Recombinant-Glase production by *B. subtilis* WB600/pMGI in shake flask

3 讨论

本实验室前期已将 Glase 在大肠杆菌中成功表达,但是为了更好地满足食品工业的安全要求,从国际公认的食品工业安全宿主菌 (GRAS) 着眼,选择枯草杆菌这种工业上常用的工程菌尝试表达 Glase 酶。研究首先将 Glase 基因分别克隆到表达载体 pHC-MC04、pMA09 和 pAL12 上,转化 *B. subtilis* TEB1030^[13]、*B. subtilis* WB600 和 *B. subtilis* WB800N (npr Eapr EeprbprmpbrenprB :: bsr . vprwprA : hyg cm : neo; NeoR), 仅 *B. subtilis* WB600 所获得的基因工程重组菌能产 Glase,而其他两个宿主菌均不能表达目的酶,相对于 WB600 敲除 6 个酶基因,TEB1030 敲除 4 个酶基因,WB800N 敲除 8 个酶基因,可能 WB600 的表达系统更适合 Glase 的表达。而从 Glase 的产酶效率上看, pMA09 > pAL12 > pHC-MC04。最后选择组成型表达菌株 WB600/pMGI 进一步发酵优化,将该菌以 TB 为培养基,初始 pH 7.0, 30℃ 恒温培养 24 h 后,测得发酵上清液酶活 5.6 U/mL,为培养野生菌 *Thermobifida fusca* 产 Glase 酶量的 12.3 倍,是已知外源 Glase 在枯草杆菌最高表达量的 3.5 倍。本研究为探索 Glase 在枯草杆菌中的表达和生产提供了重要的参考。

参 考 文 献

- [1] Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Annual subject and author indexes [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87 Supl: 10 069 - 10 240.
- [2] Nam S W, Park H Y, Kim J H, et al. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biotechnol Lett, 2001, 23 (9): 727 - 730.
- [3] DENG Hui, CHEN Sheng, WU Dan, et al. Heterologous expression and biochemical characterization of glucose isomerase from *Thermobifida fusca* [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37 (6): 1 211 - 1 219.
- [4] SL W. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins [J]. Curr Opin Biotechnol, 1995, 6 (5): 517 - 522.
- [5] Westers L, Westers H, Quax W J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism [J]. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2004, 1694 (1 - 3): 299 - 310.
- [6] Huang J J, Ho N W. Cloning and expression of the *Escherichia coli* D-xylose isomerase gene in *Bacillus subtilis* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1985, 126 (3): 1 154 - 1 160.
- [7] Lee C Y, Bhatnagar L, Saha B C, et al. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* glucose isomerase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56 (9): 2 638 - 2 643.
- [8] Nguyen H D, Nguyen Q A, Ferreira R C, et al. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability [J]. Plasmid, 2005, 54 (3): 241 - 248.
- [9] ZHANG J, KANG Z, LING Z, et al. High-level extracellular production of alkaline polygalacturonate lyase in *Bacillus subtilis* with optimized regulatory elements [J]. Bioresource technology, 2013, 146 (10): 543 - 548.
- [10] Ai T T L, Schumann W. A novel cold-inducible expression system for *Bacillus subtilis* [J]. Protein Expression & Purification, 2007, 53 (2): 264 - 269.
- [11] Sambrook J F E, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Michal G, Moellering H, Gruber W. Enzymatic determination of fructose-1-phosphate [J]. Enzymol Biol Clin (Basel), 1968, 9 (2): 154 - 159.
- [13] Eggert T, Brockmeier U, Dröge M J, et al. Extracellular lipases from *Bacillus subtilis*: regulation of gene expression and enzyme activity by amino acid supply and external pH [J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 225 (2): 319 - 324.

Expression of glucose isomerase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus subtilis*

DENG Hui^{1,2,3}, CHEN Cun-wu¹, SUN Chuan-bo¹, WEI Chuan-bao^{1,2}

1 (College of Biology and Pharmaceutical Engineering, West Anhui University, Liu'an 237012, China)

2 (Research Center of Protein Separation and Purification, Liu'an 237012, China)

ABSTRACT For reaching expressive effect of Glase in *Bacillus subtilis*, *Thermobifida fusca* Glase gene *xylA* was amplified by PCR, and cloned the gene sequences into shuttle carriers with different induced expression pattern: pH-CMC04, pMA09, pAL12, and then transformed to *Bacillus subtilis* WB600. The results showed that enzyme production of *Bacillus subtilis* containing recombinant plasmid pMA09-*xylA* was optimal, reached 1.8 U/mL. Fermentation conditions of the recombinant *Bacillus subtilis* were further optimized, selecting fermentation culture medium for TB, initial pH 7.0, the temperature of 30 °C, shake flask culture after 24 h, the yield of Glase reached 5.6 U/mL.

Key words *Bacillus subtilis*; *Thermobifida fusca* Glase; expression in *Bacillus subtilis*; fermentation optimization

(上接第 30 页)

Purification and identification of AFB₁ lytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens*

CAI Guo-lin^{1,2,3}, XU Ming-qian^{2,3},
LI Qiu⁴, WANG Shan-shan⁴, DU Zu-bo⁴, LU Jian^{1,2,3}

1 (The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2 (National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

3 (School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) 4 (Shandong Luhua Group Co., Ltd., Laiyang 265200, China)

ABSTRACT *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC-9021 can biodegrade the AFB₁ efficiently. Study on its active protein and possible mechanism is prerequisite to industry application. The active protein was purified from fermented liquid of *B. amyloliquefaciens* CGMCC-9021 by ammonium sulfate precipitation, followed by DEAE FF and Superdex 75 gel filtration chromatography. The purified protein was identified as lytic enzyme (*M_r* 27 ku) by Tricine-SDS-PAGE and tandem mass spectrometry (MS/MS). In addition, the fluorescence spectrometry of AFB₁ degradation product was studied. Results showed the possible mechanism of AFB₁ biodegradation was that the lactone ring structure of AFB₁ was cleaved by the lytic enzyme.

Key words *Bacillus amyloliquefaciens*; aflatoxin B₁; purification; lytic enzyme