

长野芽胞杆菌 (*Bacillus naganoensis*) 普鲁兰酶在大肠杆菌中的活性表达与分泌调控

严伟, 聂尧*, 徐岩*

江南大学生物工程学院, 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

摘要: 【目的】从长野芽胞杆菌 (*Bacillus naganoensis*) JNB-1 中克隆出普鲁兰酶基因并在大肠杆菌系统中表达, 通过优化诱导条件和使用化学添加剂提高了胞外酶活。【方法】采用 PCR 方法, 从 *B. naganoensis* 基因组中扩增出普鲁兰酶基因 *pul*, 构建重组菌 *E. coli* BL21/pET-20b-*pul*。通过优化, 确定优化后的 IPTG 诱导条件以及甘氨酸、 Na^+ 的最佳添加参数。【结果】普鲁兰酶在大肠杆菌中得到有效表达, 其相对分子质量为 119kDa。在优化后的诱导条件 (诱导温度 20℃, IPTG 终浓度 0.4 mmol/L, 在菌体 OD_{600} 至 1.2 时诱导) 下, 普鲁兰酶的总酶活达到 10.8 U/mL。添加甘氨酸和 Na^+ 均能有效促进普鲁兰酶的分泌。在诱导时添加终浓度 0.08 mol/L 的甘氨酸和 0.2 mol/L Na^+ , 胞外酶活提高至 8.1 U/mL, 是不加任何添加剂的 10.3 倍。【结论】该重组菌的构建为普鲁兰酶制剂的工业生产提供了有价值的菌株, 对化学添加剂促进分泌的研究也为重组酶的高水平胞外生产提供了有效的方法。

关键词: 普鲁兰酶, 基因克隆和表达, 诱导条件, 优化, 化学添加剂, 分泌

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 02-0145-09

普鲁兰酶 (EC 3.2.1.41) 是一类催化未修饰底物 (如支链淀粉、普鲁兰及相关聚合物) 的 α -1,6-葡萄糖苷键水解的脱支酶。普鲁兰酶在工业中的主要功能是提高淀粉糖化过程的效率, 这是因为在糖化过程中, 当普鲁兰酶与葡萄糖淀粉酶共同使用时, 普鲁兰酶可特异性水解支链淀粉的分支点, 而葡萄糖淀粉酶只需水解线性的 α -1,4-葡萄糖苷键, 因此使用普鲁兰酶可加速糖化过程并减少葡萄糖淀粉酶的使用总量^[1-2]。目前已发现多种产普鲁兰酶的微生物^[3-6], 但由于淀粉糖化过程在较高的温度 (55-65℃)、微酸性 (pH 4.5-5.5) 条件下进行^[7], 真正

可以与葡萄糖淀粉酶相配合使用的普鲁兰酶却很少。目前国际上普鲁兰酶的工业化生产主要被丹麦的诺维信公司所垄断, 杰能科公司也有商品化的普鲁兰酶。而在我国, 普鲁兰酶仅局限于实验室研究, 且酶活较低, 所以开发普鲁兰酶对于食品工业和制糖工业领域具有重要的工业价值。

虽然许多产普鲁兰酶的微生物已被发现, 但大多数野生菌种的发酵酶活很低, 限制了其在工业上的应用。通过选择合适的宿主和载体进行异源表达是获得更高的蛋白表达水平的有效方法^[8]。至今已有多普鲁兰酶基因得到了异源表达^[6, 9-13], 但

基金项目: 国家“863 计划”——国家高科技研究发展计划项目 (2012AA022207); 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划 (2011CB710800, 2009CB724706); 高等学校学科创新引智计划 (111 计划, 111-2-06); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者。聂尧, Tel: +86-510-85197760, Fax: +86-510-85918201; 徐岩, Tel: +86-510-85918201, Fax: +86-510-85864112, E-mail: biosean@yahoo.com.cn

作者简介: 严伟 (1987-), 男, 江苏丹阳人, 硕士研究生, 主要从事酶技术研究。E-mail: yanweihades@163.com

收稿日期: 2012-07-16; **修回日期:** 2012-11-12

总体上看,大部分重组表达的例子都是针对新发现的普鲁兰酶作性质研究,旨在提高普鲁兰酶表达量的研究报道极少,且普鲁兰酶表达量不高,并且其中耐酸性的普鲁兰酶较少。长野芽胞杆菌 (*Bacillus naganoensis*) 的普鲁兰酶最适温度 62.5℃, 最适 pH 4.5 - 5.0, 有底物存在的条件下, 在 60℃、pH 4.5 下半衰期达 232 h^[4], 其最适温度和 pH 符合糖化过程的条件。并且在 60℃ 下, 诺维信公司商品酶在 pH 4.5 和 5.0 下的半衰期仅分别为 5.9 min 和 14.1 min, 而长野芽胞杆菌普鲁兰酶则分别达到 21.6 min 和 49.8 min^[4], 表明长野芽胞杆菌的普鲁兰酶比诺维信商品酶的热稳定性更优越, 更适合用于淀粉糖化过程。大肠杆菌表达系统具有遗传背景清楚、使用方便、生长快速、蛋白表达水平高、易于高密度发酵等众多优点^[8], 因此多达约 60% 的重组蛋白在大肠杆菌系统中表达^[15]。普鲁兰酶的异源表达也主要在大肠杆菌系统中进行, 但酶活水平较低。

本研究从 *B. naganoensis* 中克隆出普鲁兰酶基因 *pul*, 构建重组大肠杆菌。通过诱导条件的优化, 将普鲁兰酶的总酶活提高至 10.8 U/mL。通过向培养液中加入化学添加剂增强了重组酶的分泌, 将大部分积累在周质空间的重组酶转移到了胞外, 最终胞外酶活达到 8.1 U/mL, 是不添加任何添加剂的 10.3 倍。本研究为具有优良酶学特性的 *B. naganoensis* 普鲁兰酶的工业化生产奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:长野芽胞杆菌 (*B. naganoensis*) JNB-1, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109、BL21 (DE3) 本实验室保藏; 克隆质粒 pMD19-T simple vector 购自 TaKaRa 公司, pET-20b(+) 购自 Novagen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器:LA Taq DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司, isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) 购自上海生工生物工程公司, 细菌基因组提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 OMEGA BIO-TEK, 普鲁兰酶购自东京化成工业株式会社 (TCI), 引物由上海生工生物工程公司合成, 其余

试剂均为国产分析纯。超声破碎仪 VCX750 购自 Sonic 公司; 恒温水浴锅购自上海华连医疗器械有限公司; 凝胶成像仪、PCR 仪、DNA 电泳仪、蛋白电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 酶标仪购自 Thermo 公司。

1.1.3 培养基:长野芽胞杆菌培养基: CaCl₂ 0.25 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, (NH₄)₂ SO₄ 0.2 g/L, 酵母提取物 2 g/L, 无水葡萄糖 5 g/L, KH₂ PO₄ 3 g/L, 无机盐溶液 0.1% (v/v), pH 5.0; 无机盐溶液: ZnSO₄·7H₂O 0.1 g/L, MnCl₂·H₂O 0.03 g/L, H₃BO₃ 0.3 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.2 g/L, CuCl₂·2H₂O 0.01 g/L, NiCl₂·6H₂O 0.02 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.03 g/L; LB 固体培养基在 LB 液体培养基^[12]基础上加琼脂粉 15 g/L。LB 液体与固体培养基在使用前加氨苄青霉素至终浓度 100 mg/L。

1.2 基因组 DNA 和质粒的提取

B. naganoensis JNB-1 基因组的提取参照细菌基因组提取试剂盒说明书方法 (北京天根生化科技有限公司)。质粒提取参照质粒提取试剂盒说明书的方法进行 (TaKaRa 公司)。

1.3 *pul* 基因的克隆

根据 *B. naganoensis* 的普鲁兰酶基因序列 (GenBank Accession No. JN872757.1), 设计引物如下: *pul*-F: 5'-GAACAGGATCCAGATGGGAACACCA CAAAC-3' (含有 *Bam*HI 酶切位点), *pul*-R: 5'-ATTCCCTCGAGTTTACCATCAGATGGGCT-3' (含有 *Xho*I 酶切位点)。以 *B. naganoensis* JNB-1 基因组为模板, 采用 PCR 方法扩增 *pul* 基因, 扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 1 min、60℃ 0.5 min、72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物经胶回收纯化后, 与 pMD19-T 在 16℃ 下连接 4 h, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 经酶切验证获得阳性质粒 T-*pul*。基因测序由上海生工生物工程公司完成。

1.4 重组表达载体的构建

用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 分别对载体 pET-20b(+) 和质粒 T-*pul* 进行双酶切, 胶回收 pET-20b(+) 线性载体和目标基因, 用 T4 DNA Ligase 在 16℃ 下连接载体和目标基因过夜, 连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布氨苄抗生素抗性平板, 通过对转化子酶切验证和测序, 确认获得阳性克隆 *E. coli* BL21/pET-20b-*pul*。

1.5 目标基因的诱导表达

重组菌的单菌落接种至含有氨苄抗生素的 5 mL LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 振荡培养过夜。种子液转接至含有氨苄抗生素的 50 mL LB 液体培养基中, 37℃、200 r/min 振荡培养。当菌体的 OD_{600} 达到 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 于 25℃ 下诱导 18 h。除另行说明外, 化学添加剂在诱导时加入。细胞总蛋白和胞内组分经 SDS-PAGE 检测。

1.6 诱导条件的优化

以诱导温度 25℃、IPTG 终浓度 0.5 mmol/L、 OD_{600} 达 0.6 - 0.8 时诱导为初始诱导条件, 分别变化诱导温度 (20℃ - 37℃)、IPTG 终浓度 (0 mmol/L - 0.8 mmol/L) 和诱导时机 (OD_{600} 0.4 - 1.4), 诱导 18 h, 比较细胞内外的酶活水平。IPTG 浓度和诱导时机的优化均在 20℃ 下诱导。

1.7 普鲁兰酶酶活测定

量取 20 mL 发酵液, 于 9798 × g 离心 20 min, 上清液保留为胞外组分。菌体沉淀经生理盐水洗涤 2 次, 用 pH 4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液重悬并定容至 20 mL。超声破碎后 17418 × g 离心 20 min 取上清液, 即为胞内组分。酶活测定方法根据 Jinho Kang^[16] 的方法修改: 反应温度改为 60℃, 缓冲体系为 0.1 mol/L pH 4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液。一个单位的普鲁兰酶活力定义为在测定条件下, 每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶的量。所有酶活测定结果为 3 次重复平行试验数据的平均值。总酶活为胞外酶活与胞内酶活测定值的加和。

1.8 细胞分级分离

20 mL 菌液于 9798 × g 离心 20 min, 收集上清液为胞外组分。菌体沉淀用生理盐水洗两遍, 完全重悬于含有 25% (w/v) 蔗糖和 1 mM EDTA 的相同体积的处理液。冰浴处理过夜后 17418 × g、4℃ 离心 20 min, 上清液为周质组分^[17]。沉淀用 pH 4.5 的乙酸-乙酸钠缓冲液重悬并定容至 20 mL, 超声破碎后 17418 × g、4℃ 离心 10 min, 上清液为细胞质组分。

2 结果和讨论

2.1 普鲁兰酶基因的克隆与表达

以 *B. naganensis* 基因组为模板, 采用 PCR 扩增获得普鲁兰酶编码基因。纯化后的 PCR 产物与

pMD19-Tsimple vector 连接, 经酶切鉴定, 获得重组质粒 T-pul。基因测序结果表明, *pul* 基因序列与 GenBank 报道的序列一致。基因长度 2781 bp, 编码 926 个氨基酸。

按照 1.4 中的方法构建重组表达质粒 pET20b (+)-*pul*。将重组质粒 pET20b (+)-*pul* 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。重组菌经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 分析结果显示 (图 1), 重组菌在接近 120 kDa 处比对照多出一条蛋白条带, 表明普鲁兰酶在大肠杆菌中获得表达, 其相对分子质量约为 119 kDa, 与预期大小一致。提取胞内酶液, 考察温度和 pH 对粗酶液酶活力的影响。由图 2, 测得粗酶的最适温度为 62.5℃, 最适 pH 为 4.5, 并且 pH 在 4.5 - 5.0 内可保持超过 90% 的酶活, 表明由该大肠杆菌系统表达的重组普鲁兰酶与野生长野芽胞杆菌来源的普鲁兰酶相同, 均具有的适合糖化过程条件的优良酶学特性。

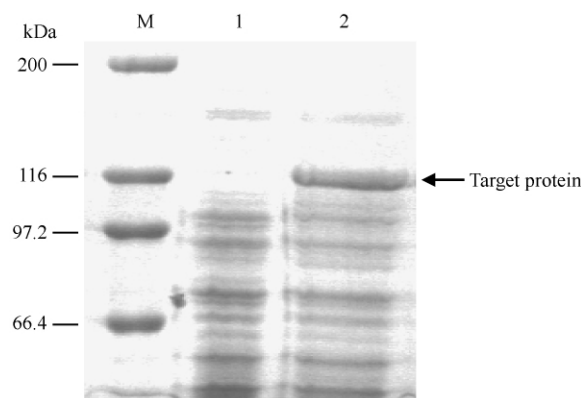


图 1 重组蛋白诱导表达结果

Fig. 1 Expression result of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3). M. Protein Marker; 1. *E. coli* BL21/pET-20b (+) after induction; 2. *E. coli* BL21/pET-20b (+)-*pul* after induction with 0.5 mmol/L IPTG.

2.2 重组酶诱导表达条件优化

2.2.1 诱导温度对重组酶表达的影响: 通常, 在较高温度 (如 30℃) 下诱导, 重组菌合成蛋白质的速度较快, 但此时外源蛋白的肽链会因来不及折叠而形成不可溶的包涵体; 低温 (如 15 - 25℃) 诱导减慢了蛋白合成的速度, 使新合成的肽链能正确折叠, 减少了包涵体的形成^[8]。因此, 当寻找外源蛋白活性表达的合适条件时, 选择合成的诱导温度极其重要。图 3-A 显示, 在 30℃ 下诱导时, 胞外酶活最高; 20℃ 下诱导时胞内酶活和总酶活最高, 分别达到

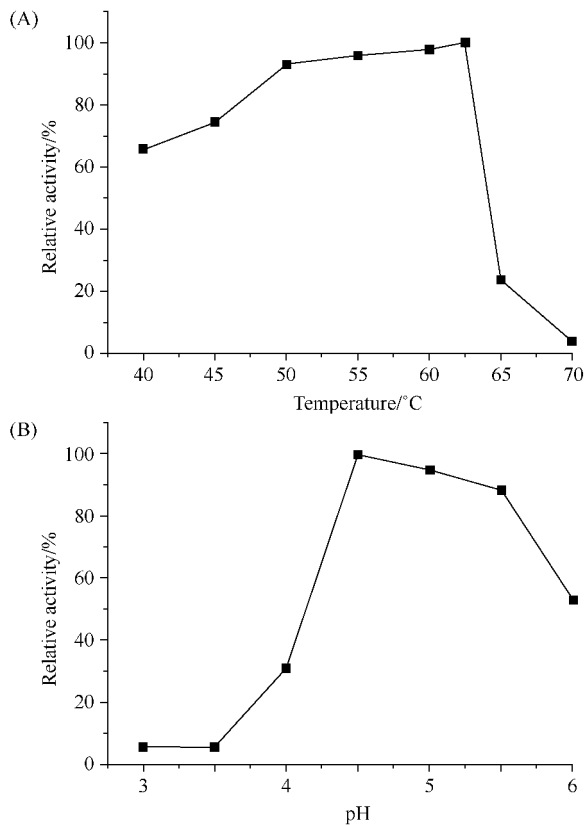


图2 温度(A)和pH(B)对重组酶活力的影响

Fig.2 The influence of temperature (A) and pH (B) on the recombinant pullulanase activity.

2.9 U/mL和3.5 U/mL。考虑在 20°C 下诱导时,总酶活远远高于其他诱导温度的酶活水平,因此选择在 20°C 下诱导以获得最高水平的活性表达,后期再通过促进重组酶分泌的方法将活性重组酶分泌至胞外,以获得高水平的胞外酶活。

2.2.2 IPTG 浓度对重组酶表达的影响:诱导物 IPTG 的不同浓度对应了不同的表达强度,直接影响目标蛋白的表达。图 3-B 显示,在不同的 IPTG 浓度下,胞外酶活较低且并没有显示出明显的规律;而胞内酶活和总酶活则在添加终浓度 0.4 mmol/L IPTG 时达到最高,说明最佳的 IPTG 使用浓度为 0.4 mmol/L。

2.2.3 诱导时的菌体状态对重组酶表达的影响:重组大肠杆菌的生长状态对目标重组蛋白的表达及转运分泌具有一定的影响作用,同时诱导时的菌体量也直接影响着最终的目标蛋白产量。图 3-C 显示,在菌体生长至不同的 OD_{600} 下诱导,目标蛋白的产量差异显著。其中当菌体的 OD_{600} 达到 1.2 时,目标蛋白的产量最高,总酶活达到 9.5 U/mL。

□ Intracellular activity ● Extracellular activity ▲ Total activity

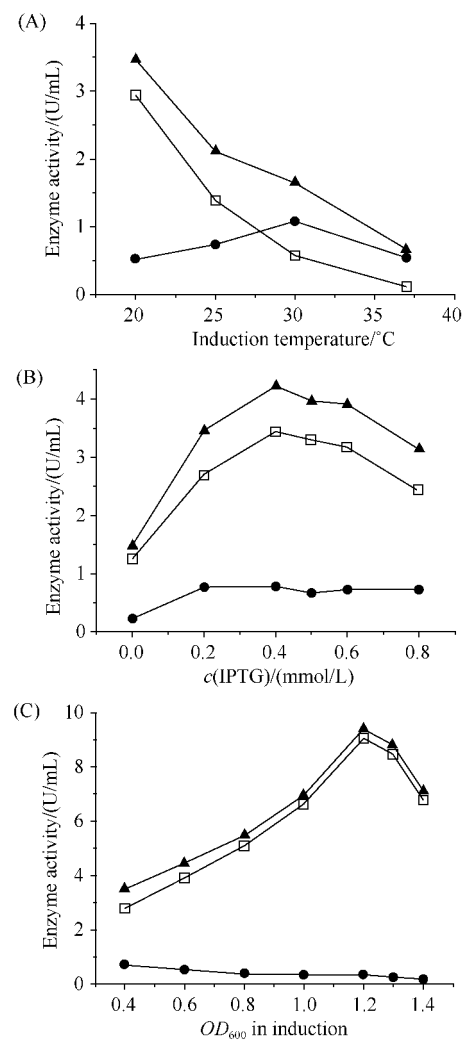


图3 不同的诱导条件对酶活水平的影响

Fig.3 The influence of different conditions on the recombinant enzyme activity. A: The effect of induction temperature on enzyme activity. The *E. coli* culture was induced at OD_{600} of 0.6, with 0.5 mmol/L IPTG; B: The effect of concentration of IPTG on enzyme activity. The *E. coli* culture was induced at 20°C and OD_{600} of 0.6; C: The effect of OD_{600} in induction on enzyme activity. The *E. coli* culture was induced at 20°C with 0.5 mmol/L IPTG.

2.2.4 采用优化条件的发酵过程曲线:组合使用上述单因素优化后的诱导条件,进行摇瓶发酵。从诱导时开始,检测重组菌的生长情况(即 OD_{600})和胞内外酶活,获得重组菌发酵的过程曲线(图 4)。菌体浓度在诱导后约 8 h 后达到稳定期。胞外酶活的变化不大,且一直处于较低的水平;胞内酶活则在诱导后迅速增加,诱导后约 6 h 时接近胞内酶活的最高值。诱导 6 h 以后胞内酶活变化很小,最高值约为

10.5 U/mL, 最高总酶活约为10.8 U/mL。胞内可溶组分和细胞总蛋白的 SDS-PAGE 分析也显示, 诱导 6 h 以后胞内的目标蛋白量变化不大。

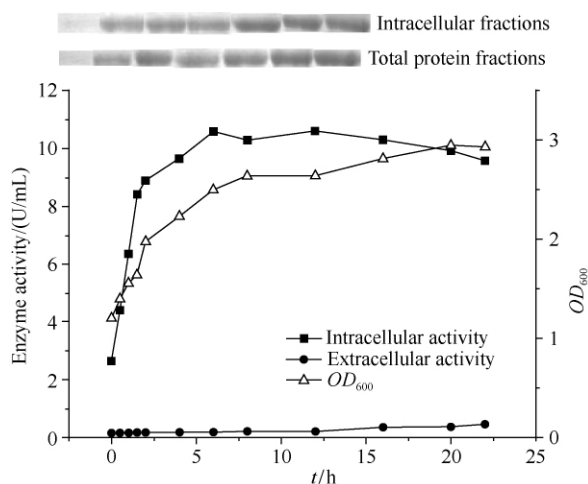


图 4 重组菌的发酵过程曲线

Fig. 4 Fermentation process curve of recombinant *E. coli*.

2.3 重组酶在细胞中的定位

由上述结果, 重组酶在胞内已达到较高的酶活水平。由于载体 pET-20b (+) 上带有 PelB 信号肽, 新合成的前蛋白可通过大肠杆菌分泌系统转运至周质空间^[18-19]。为确证重组酶在细胞中的位置, 本研究提取了胞外组分、细胞周质空间组分和细胞质组分, 测得各部分普鲁兰酶活力分别为 0.4 U/mL、9.1 U/mL 和 0.9 U/mL (图 5)。结果显示, 重组酶活力大部分集中在周质, 表明在 PelB 信号肽的帮助下, 大部分重组酶被分泌到了周质并在周质中积累。由于渗漏作用, 有少量的重组酶到达了胞外^[20]。

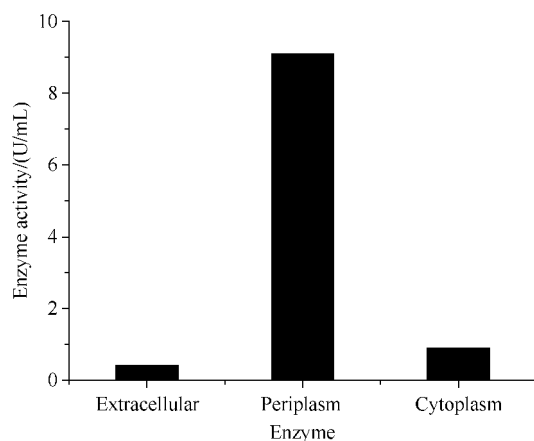


图 5 重组菌各组分的普鲁兰酶酶活

Fig. 5 Pullulanase activity in different fractions of recombinant *E. coli*.

2.4 添加剂对重组酶分泌的促进作用

通过以上的诱导条件优化, 重组酶的表达量得到较大幅度的提高, 但大部分重组酶都位于周质, 并未到达胞外。这是由于: (1) pET-20b (+) 载体上的 PelB 信号肽主要用于外源蛋白在周质空间的积累, 重组酶定位于周质空间, 需要依靠渗漏作用才能到达胞外; (2) 所选的诱导条件并不利于重组酶向胞外渗漏。

为了提高胞外酶活, 需要研究增强分泌的方法, 以促进位于周质空间的重组酶向胞外分泌。本研究尝试向培养基中加入化学添加剂, 通过研究添加剂的种类、使用浓度、添加时间等参数和复合效果, 以获得较高的胞外酶活。根据图 4, 发酵约 7 h 后胞内外总酶活几乎是定值, 此时胞外酶活越高, 即有越多的重组酶转移至胞外, 因此本研究测定了加入添加剂后胞外酶活的变化情况, 以比较不同条件促进重组酶分泌的效果。

2.4.1 使用破坏细胞结构的添加剂对重组酶分泌的影响: 根据文献报道, 一些添加剂 (如甘氨酸)、某些表面活性剂 (如 Triton X-100、吐温 80 等) 和渗透压调节剂 (如 Na⁺) 可以增加细胞壁的通透性, 进而促进周质中的蛋白分泌到胞外^[17]。

(1) 不同种类的添加剂对重组酶分泌的作用比较: 本研究在诱导时分别加入 Triton X-100、Tween 80 和甘氨酸, 发酵 18h, 比较了这 3 种添加剂对分泌的促进作用。表 1 显示, Tween 80 的添加对目标蛋白的分泌并没有明显的促进作用; Triton X-100 和甘氨酸都能有效地促进目标蛋白的分泌, 并且甘氨酸的促进作用明显强于 Triton X-100。因此选择甘氨酸为最佳的添加剂。

表 1 不同化学添加剂对产胞外普鲁兰酶的影响
Table 1 The influence of different chemical additives on extracellular pullulanase production

Additive	Concentration of additive / %	Extracellular activity / (U/mL)
Control	-	0.5
Triton X-100	0.05	1.5
Triton X-100	0.1	2.9
Triton X-100	0.3	3.6
Tween 80	0.5	0.6
Tween 80	1.5	0.9
Tween 80	3	1.1
Glycine	0.3	4
Glycine	0.75	5.2
Glycine	1.2	5.4

(2) 甘氨酸浓度和添加时机对重组酶分泌的影响:使用甘氨酸增强重组酶的分泌,可能的机制是甘氨酸诱导了细胞壁上肽聚糖结构变化,使细胞通透性显著提高^[17]。增加甘氨酸使用浓度可增加细胞通透性,从而增强促进分泌的效果,但甘氨酸的加入对菌体的生长活性有一定的抑制作用^[17],可能会影响到菌体活性和目标蛋白的合成。本研究在诱导时分别加入甘氨酸至不同的终浓度,以不加甘氨酸作为对照,考察了不同的甘氨酸使用浓度对分泌的促进作用,以寻求甘氨酸的最适使用浓度。由图 6-A 可知,添加 0.04 mol/L 甘氨酸的促进分泌的作用相对较弱;添加 0.08 mol/L 及更高浓度的甘氨酸时促进分泌的作用相对较强,且添加 0.08 mol/L 及以上的甘氨酸,促进分泌的效果比较接近。但另一方面,甘氨酸的浓度越高,对菌体生长的抑制作用越强。添加终浓度 0.04 mol/L、0.08 mol/L 和 0.16 mol/L 的甘氨酸,发酵结束时的菌体 OD_{600} 分别为 1.9、1.16 和 0.67,分别为对照的 63.3%、38.7% 和 22.3%。考虑到甘氨酸对菌体生长的抑制作用,结合胞外酶活水平,选择终浓度 0.08 mol/L 作为甘氨酸的最佳使用浓度。此时胞外酶活达到 5.5 U/mL,是不加入添加剂的 9.2 倍。

另外,本研究考察了在诱导后的不同时间点添加终浓度 0.08 mol/L 甘氨酸的影响。由图 6B 可知,在诱导后的 0 h、2 h、4 h 分别添加甘氨酸,发酵结束时,胞外酶活相近。而在诱导后 8 h 添加甘氨酸,胞外酶活显著低于其他水平,表明添加甘氨酸的时间过晚会影响甘氨酸促进分泌的效果。诱导后 0 h (即诱导时) 添加甘氨酸的胞外酶活稍高于其他水平,因此选择在诱导时添加甘氨酸。

2.4.2 渗透压添加剂 Na^+ 的使用对重组酶分泌的影响:本研究考察了 Na^+ 的添加对目标蛋白胞外分泌的影响,所用钠盐为 NaCl。图 6-A 显示,添加 Na^+ 对胞外分泌有一定的促进作用,但不同的 Na^+ 添加浓度对胞外分泌没有太大影响。其中添加 0.2 mol/L Na^+ 的胞外酶活略高于其他水平。图 6-B 则显示, Na^+ 添加时间越晚,促进分泌的作用越弱。因此选择在诱导后 0 h 添加 Na^+ 。由图 6-B,在诱导时添加 Na^+ 至 0.2 mol/L,发酵结束时的胞外酶活最高,约为 3.6 U/mL,是不加添加剂的 4 倍。

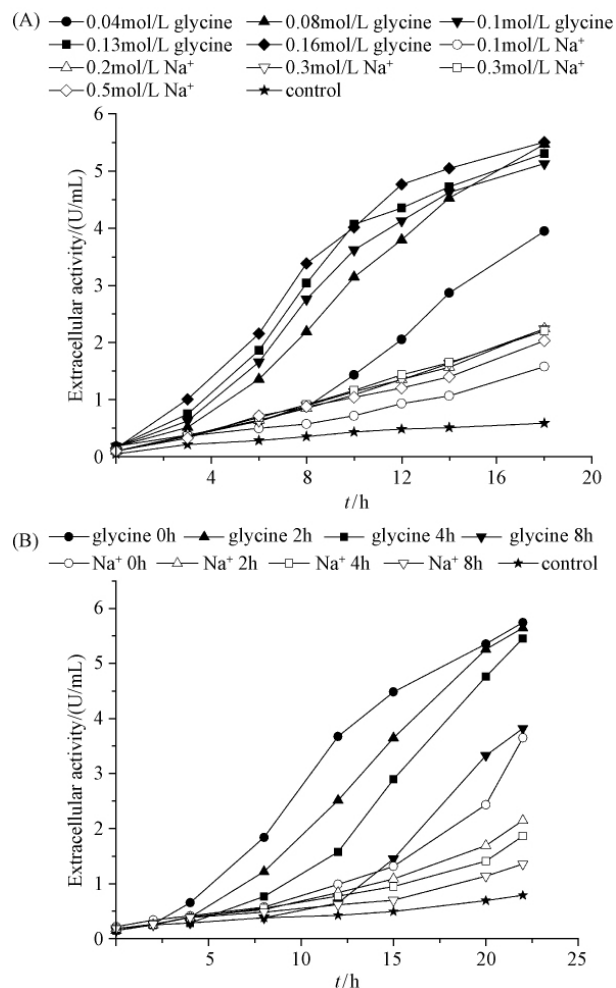


图 6 甘氨酸和 Na^+ 的不同浓度 (A) 和添加时间 (B) 对产胞外普鲁兰酶的影响

Fig. 6 The influence of final concentration (A) and addition time (B) of glycine and Na^+ on extracellular pullulanase production. A: The effect of different final concentration of glycine and Na^+ on extracellular pullulanase production; B: The effect of addition time of glycine and Na^+ on extracellular pullulanase production.

2.4.3 甘氨酸和 Na^+ 复合作用对重组酶分泌的影响:由于甘氨酸和 Na^+ 对重组酶的胞外分泌均有明显的促进作用,因此组合使用上述的最优条件,在诱导时向发酵液中同时加入 0.08 mol/L 的甘氨酸和 0.2 mol/L 的 Na^+ ,测定胞外酶活的变化曲线,与分别添加甘氨酸、 Na^+ 和不使用添加剂进行比较。

图 7 表明,甘氨酸和 Na^+ 同时添加的效果明显优于单独添加。在诱导时单独添加甘氨酸,处理 22 h 后胞外酶活为 5.7 U/mL;诱导时单独添加 Na^+ ,最终的胞外酶活为 3.6 U/mL,分别为不使用

添加剂的 7.3 倍和 4.5 倍。相比之下,同时添加甘氨酸和 Na^+ , 胞外酶活达到 8.1 U/mL, 是不使用添加剂的 10.3 倍。另外,同时添加甘氨酸和 Na^+ , 最终胞内酶活为 2.2 U/mL, 即约有 78% 的活性重组酶被转移到了胞外, 表明添加剂的复合使用, 极大地减少了重组酶在周质中的残留。

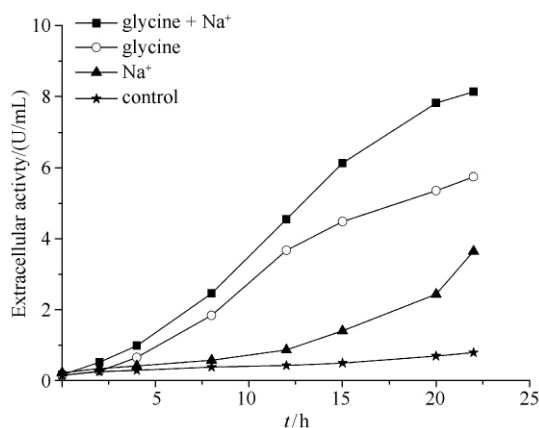


图 7 同时添加与单独添加甘氨酸和 Na^+ 对产胞外普鲁兰酶的影响

Fig. 7 The influence of glycine and Na^+ addition simultaneously and separately on extracellular pullulanase production.

3 结论

本文从 *B. naganensis* 中克隆出普鲁兰酶基因 *pul*, 构建了重组菌 *E. coli*BL21/pET-20b-pul。普鲁兰酶得到了有效表达, 其相对分子质量为 119 kDa。单因素优化得到的诱导条件为: 诱导温度 20°C, IPTG 终浓度 0.4 mmol/L, 在菌体 OD_{600} 至 1.2 时诱导。在此诱导条件下, 重组普鲁兰酶的总酶活达到 10.8 U/mL, 这在以大肠杆菌为表达系统表达普鲁兰酶的研究中处于较高水平。但大部分重组酶都位于周质中, 并未到达胞外。

目前有多种方法使周质中的蛋白释放到胞外, 如将目标蛋白与分泌能力强的蛋白融合表达、使用蛋白 A 信号序列、共表达细菌素释放蛋白和添加甘氨酸等化学添加剂等等^[19]。微生物细胞膜对胞内外物料的转运具有高度的选择性, 对细胞通透性的改变通常可以改变物料的吸收速率和代谢物的输出速率。向培养基中添加分泌促进剂简单有效, 是用

大肠杆菌表达系统生产胞外重组蛋白时常用的方法。某些试剂可作用于细胞表面的一些成分, 破坏细胞壁或细胞膜的完整性以增加细胞通透性。比如, 某些表面活性剂, 如 Triton X-100, 可以溶解脂质; 甘氨酸则可以破坏细胞壁上的肽聚糖^[17]。另外, 渗透压调节剂 Na^+ 可以增强培养基离子强度并改变渗透压。在细胞内外的渗透压差作用下, 细胞通透性改变, 从而促进胞内物质的分泌。在研究中发现, 添加甘氨酸和 Na^+ 均能有效促进重组酶的分泌。该添加剂促进分泌的结果与 Ding 等^[17] 的研究结果一致。在诱导时单独添加甘氨酸或添加 Na^+ , 胞外酶活可分别提高至 5.7 U/mL 和 3.6 U/mL; 而二者的复合使用可以将胞外酶活提高至 8.1 U/mL, 是不加入添加剂的 10.3 倍, 约有 78% 的活性重组酶被转移到了胞外, 表明甘氨酸和 Na^+ 的同时使用可以更大程度地增强分泌效果, 减少重组酶在细胞中的残留。

该重组大肠杆菌的构建, 为具有优良酶学特性的普鲁兰酶制剂的工业生产提供了有价值的菌株。同时, 通过对化学添加剂的使用参数进行研究, 重组菌的细胞通透性得到很大提高, 使积累在周质和细胞质中的大部分重组酶被释放到了胞外, 该促进分泌的效果非常明显。该研究成果也为重组酶的高水平胞外生产提供了极有参考价值的方法。

参考文献

- [1] Hii SL, Ling TC, Mohamad R, Ariff AB. Enhancement of extracellular pullulanase production by *Raoultella planticola* DSMZ 4617 using optimized medium based on sago starch. *The Open Biotechnology Journal*, 2009, 3:1-8.
- [2] Jiao YL, Wang SJ, Lv MS, Xu JL, Fang YW, Liu S. A GH57 Family Amylopullulanase from Deep-Sea *Thermococcus siculi*: Expression of the Gene and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Current Microbiology*, 2011, 62 (1) :222-228.
- [3] Suzuki Y, Hatagaki K, Oda H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 34 (6) : 707-714.

- [4] Vishnu C, Naveena B, Altaf M, Venkateshwar M, Reddy G. Amylopullulanase—A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L (+) lactic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38 (3-4) :545-550.
- [5] Nair S, Singhal R, Kamat M. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDA-43. *Bioresource Technology*, 2007, 98 (4) :856-859.
- [6] Duffner F, Bertoldo C, Andersen JT, Wagner K, Antranikian G. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (22) :6331.
- [7] Castro GR, Santopietro LMD, Sineriz F. Acid pullulanase from *Bacillus polymyxa* MIC-23. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992, 37:227-233.
- [8] Pablo O. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in *E. coli*: Advantages of high - throughput screening. *Biotechnology Journal*, 2011, 6:715-730.
- [9] Bertoldo C, Duffner F, Jorgensen PL, Antranikian G. Pullulanase type I from *Ferrodobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing, and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (5) :2084-2091.
- [10] Zouari Ayadi D, Ben Ali M, Jemli S, Ben Mabrouk S, Mezghani M, Ben Messaoud E, Bejar S. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78 (3) : 473-481.
- [11] Bertoldo C, Ambrecht M, Becker F, Schäfer T, Antranikian G, Liebl W. Cloning, sequencing, and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (6) :3407-3416.
- [12] Tomiyasu K, Yato K, Yasuda M, Tono-zuka T, Ibuka A, Sakai H. Cloning and Nucleotide Sequence of the Pullulanase Gene of *Thermus thermophilus* HB8 and Production of the Enzyme in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2001, 65 (9) : 2090-2094.
- [13] Michaelis S, Chapon C, d'Enfert C, Pugsley A, Schwartz M. Characterization and expression of the structural gene for pullulanase, a maltose-inducible secreted protein of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164 (2) :633-638.
- [14] Tomimura E: Thermoduric and aciduric pullulanase enzyme and method for its production. United States: 5055403. Oct. 8, 1991
- [15] Sørensen H. Towards universal systems for recombinant gene expression. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9 (1) : 27.
- [16] Kang J, Park KM, Choi KH, Park CS, Kim D, Cha J. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 48:260-266.
- [17] Ding R, Li Z, Chen S, Wu D, Wu J, Chen J. Enhanced secretion of recombinant [alpha]-cyclodextrin glucosyltransferase from *E. coli* by medium additives. *Process Biochemistry*, 2010, 45 (6) :880-886.
- [18] Waegeman H, Soetaert W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2011, 38 (12) :1891-1910.
- [19] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 1996, 60 (3) :512-538.
- [20] Lee KW, Shin HD, Lee YH. Extracellular overproduction of β -cyclodextrin glucanotransferase in a recombinant *E. coli* using secretive expression system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 12 (5) :753-759.

Expression and secretion regulation of *Bacillus naganoensis* pullulanase in recombinant *Escherichia coli*

Wei Yan, Yao Nie*, Yan Xu*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: [Objective] To increase extracellular productivity of pullulanase, pullulanase gene from *Bacillus naganoensis* JNB-1 was expressed in recombinant *Escherichia coli*, followed by optimizing induction conditions and applying chemical additives. [Methods] We amplified pullulanase gene *pul* from *B. naganoensis* genome by PCR and constructed recombinant *E. coli* BL21/pET-20b-pul. Optimal induction conditions and additive parameters of glycine and Na⁺ were determined by measuring the extracellular pullulanase activity. [Results] Pullulanase was expressed in *E. coli* with the molecular weight of 119 kDa. Under optimal induction conditions, *i. e.* induction was initiated with 0.4 mmol/L isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) at 20°C when OD₆₀₀ of bacteria culture reached 1.2, total pullulanase activity including intracellular and extracellular enzyme reached 10.8 U/mL. Addition of glycine and Na⁺ enhanced the secretion of pullulanase. With the supplementation of 0.08 mol/L glycine and 0.2 mol/L Na⁺, extracellular pullulanase activity was increased up to 8.1 U/mL, 10.3 times of that without additives. [Conclusion] A promising resource of pullulanase was achieved by construction of recombinant *E. coli* for industrial production of pullulanase, and additionally the efficient regulation method with chemical additives was developed for pullulanase secretion, which would also be useful for high-level extracellular production of recombinant enzymes.

Keywords: pullulanase, gene cloning and expression, induction conditions, optimization, chemical additives, secretion

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Project of China National Programs for Hi-tech Research and Development (2012AA022207), by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB710800, 2009CB724706), by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06) and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

* Corresponding authors. Yao Nie, Tel: +86-510-85197760, Fax: +86-510-85918201; 徐岩, Tel: +86-510-85918201, Fax: +86-510-85864112, E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: 16 July 2012/Revised: 12 November 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。