



Arthrobacter ureafaciens CZ31 丙氨酸脱氢酶可溶性表达及产酶条件优化

吴优¹, 周卫^{1*}, 李尧益², 阮涛¹, 杨忠华^{1*}

¹ 武汉科技大学化学与化工学院, 湖北 武汉 430081

² 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广东 广州 510530

摘要:【目的】克隆 *Arthrobacter ureafaciens* CZ31 丙氨酸脱氢酶的编码基因(*alanine dehydrogenase*), 转化至 *Escherichia coli* Rosetta (DE3)中构建可溶性表达 *alanine dehydrogenase (ald)*的工程菌 CZR07 并优化产酶条件。【方法】提取 *A. ureafaciens* CZ31 菌株的全基因组 DNA, 设计引物扩增出 *ald* 基因, 与 pET-28a 连接后导入 *E. coli* Rosetta 中表达并纯化重组蛋白, 以单因素实验结果为依据, 响应面法优化发酵条件。【结果】*ald* 全长为 1119 bp, 编码含 372 个氨基酸残基的蛋白质, 分子量约为 40 kDa, 酶活为 2.65 U/mg。响应面分析温度、诱导时间及诱导剂浓度的影响强度为 IPTG 浓度>温度>温度×IPTG 浓度>温度×诱导时间>IPTG 浓度×诱导时间>诱导时间。CZR07 摇瓶发酵最佳条件为温度 22 °C、IPTG 0.7 mmol/L、诱导时间 7 h, 此条件下重组酶酶活达到 15.23 U/mg, 与响应面优化的预测值相似, 较优化前提高 5.75 倍。【结论】克隆并实现了 CZ31 中 *ald* 基因的可溶性表达, 采用 BBD 法优化产酶的诱导条件, 获得显著的优化效果, 为其他工程菌株产酶条件优化提供借鉴。

关键词: *Arthrobacter ureafaciens* CZ31, 丙氨酸脱氢酶, 克隆表达, 响应面优化

丙氨酸脱氢酶是催化丙酮酸跟丙氨酸相互转化的关键酶, 在生物体内调节酮酸和氨基酸的动态平衡, 与生物体内糖代谢和氨基酸代谢密切相关^[1]。丙氨酸脱氢酶存在形式有四聚体、六聚体、八聚体 3 种, 六聚体形式最多。Tripathi^[2]解析了 *Mycobacterium tuberculosis* 中丙氨酸脱氢酶的空

间结构, 为典型的六聚体蛋白。丙氨酸脱氢酶高级结构在辅酶结合区域的氨基酸相当保守, 由 4 条平行的 β 折叠和 1 个 α 螺旋组成, 排列顺序基本一致。Galkin 和 Kulakova^[3]对来自 2 株极地菌中的丙氨酸脱氢酶进行酶学特性研究时发现, Arg 残基所构成的盐桥决定了该蛋白酶的热稳定性;

基金项目: 国家自然科学基金(21376184); 教育部留学回国人员科研启动项目

*通信作者。周卫, E-mail: zhouwei@wust.edu.cn; 杨忠华, Tel/Fax: +86-27-86563448, E-mail: yangzh@wust.edu.cn

收稿日期: 2016-11-30; 修回日期: 2017-03-14; 网络出版日期: 2017-03-28

Mycobacterium smegmatis 中 *ald* 的表达在转录水平受到 AldR 蛋白(Lrp/AsnC 蛋白家族)的调控^[4]。近年来, 研究学者已经克隆了 *Bacillus subtilis*^[5]、*Geobacillus stearothermophilus*^[6]等不同来源的丙氨酸脱氢酶基因, 并实现了在大肠杆菌中的异源表达。

响应面法在生物反应过程优化中有着广泛的应用, 响应面优化发酵培养基可以提高单位体积的生物量, 同时提高目的产物的产量。常用的响应面分析实验设计主要有 CCD (Central composite design)和 BBD (Box-benhnken design)两种方法, 其中BBD中心组合设计是一种对多个因素优化的方法, 用非线性数学模型进行拟合, 精度高, 次数少, 并且具有较好的预测效果, 通过拟合方程可以得到各因素的最佳组合并且很好地研究各因素之间的交互作用。目前响应面在生物研究方面的应用主要是采用 CCD 的实验设计方法, 对培养基组分、搅拌转速、通气等发酵培养条件进行优化, 都取得了一定的优化效果^[7-9], 但较少有文献对工程菌的产酶诱导条件进行优化。

A. ureafaciens CZ31 是本实验室从受工业废水活性污泥中筛选得到的能够高效同化氨氮的菌株, 本研究克隆该菌株中的氨同化酶丙氨酸脱氢酶, 构建基因工程菌株进行表达并通过响应面优化工程菌株的发酵产酶条件, 为后续 AlaDH 的分子酶学研究和其他功能基因克隆表达条件的优化

及原核生物氨同化机制分析提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 菌株及质粒

本研究采用的是实验室保藏的 *A. ureafaciens* CZ31(专利保藏号: CCTCCM 2014165), 是从工业废水活性污泥中分离的一种革兰氏阳性菌。宿主细胞 *E. coli* Rosetta 及表达载体 pET-28a 均为本实验室保存。

1.2 主要试剂及培养基

质粒快速提取试剂盒(Plasmid Mini Kit I)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(Gel Extraction Kit)、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker 购自 TIANGEN 公司, 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III购自 NEB 公司。LB 培养基用于筛选重组子及诱导重组子在 *E. coli* Rosetta 中表达, 实验所用引物见表 1。

1.3 *A. ureafaciens* CZ31 中 *ald* 基因的克隆

采用 CTAB/NaCl 法提取 *A. ureafaciens* CZ31 基因组 DNA, 根据 GenBank 上编号为 KUR62802.1 的同源菌株 *Arthrobacter* sp. ATCC 21022 的 *ald* 基因序列, 利用 Primer Premier5 软件设计引物, 使用 auald01F 和 auald02R 引物克隆至 pMD-18T 载体, 构建 pMD-18T-*ald*, 再用 auald03F 和 auald04R 引物亚克隆至 pET-28a, 构建 pET-28a-*ald*。PCR 反应条

表 1. PCR 扩增引物序列

Table 1. Primers used in PCR

Primer	Primer sequence (5'→3')	Purpose
auald01F	ATGATCATCGGCGTCCCTAAAG	<i>ald</i> sequencing
auald02R	TTATGCGGAGACCAGTTCGTGCCAGT	and preservation
auald03F	GCA/AGCTTACATGATCATCGGCGTCCCTAAAG	<i>ald</i> cloning
auald04R	ATCG/GATCCAGTTATGCGGAGACCAGTTCGTG	

The underlined are the cleavage sites of restriction enzyme.

件为:95 °C 5 min,30次扩增循环(94 °C 1 min,65 °C 45 s,72 °C 90 s),72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,使用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收目的基因。

1.4 重组质粒 pET28a-ald 的构建

对表达载体 pET-28a 和 *ald* 基因分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,纯化回收后,16 °C 过夜连接,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α ,在 LB/Kan(30 μ g/mL)抗性平板上筛选转化子,转化子经菌液 PCR 和重组质粒双酶切鉴定,将鉴定正确的重组质粒 PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.5 *ald* 基因在 *E. coli* Rosetta 中的诱导表达

将测序正确的重组质粒用热激法转化至 *E. coli* Rosetta 中,挑取阳性重组子至 LB/Kan(30 μ g/mL)中,37 °C 培养至 OD_{600} 为 0.4–0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,30 °C 诱导 8 h,取 100 mL 菌液,离心收集菌体,用 7 mL PBS (0.2 mol/L, pH7.4)洗涤 2 次后重悬,超声波破碎细胞,经 4 °C、10000 \times g 离心,上清液即为粗酶液,对粗酶液进行 SDS-PAGE 检测和酶活检测,以空载体 pET-28a 转化至 *E. coli* Rosetta 为对照。

1.6 细胞内含物提取及酶活测定

将 100 mL 菌液用 50 mL 离心管 4 °C、8000 r/min 离心 10 min,收集菌体,Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH8.0)振荡洗涤 2 次,5 mL Tris-HCl 缓冲液(含 300 μ g/mL 溶菌酶)重悬,反复冻融 3 次;采用细胞超声破碎仪,在冰浴中 3 s 超声,5 s 间隔,功率 400 W,99 次,2 轮超声后,22000 \times g 离心 30 min 即获得细菌胞内液(粗酶液)。

AlaDH 酶活测定的反应体系为:1.0 mL 丙酮

酸反应液+0.8 mL ddH₂O+0.1 mL 0.3 mmol/L 的 NADH+0.1 mL 粗酶液,将反应液预热后加入 NADH 和粗酶液,30 °C 反应 1 min,340 nm 处测定吸光值。以去离子水代替丙酮酸反应液和未导入目的基因的宿主菌诱导后的上清液作为对照。将 1 min 内还原 1 μ mol NADH 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.7 表达条件的响应面优化

在 LB 培养基基础上探究诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度对重组菌产酶的影响,对每个因素进行单因素梯度实验,诱导温度 10–30 °C,5 °C 为一个梯度;诱导时间 3–11 h,2 h 为一个梯度;IPTG 浓度 0.2–1.0 mmol/L,0.2 mmol/L 为 1 个梯度。

在单因素实验确定 3 个因素最佳值的基础上用 BBD 实验设计方案,探究 3 个因素对重组菌产酶的交互影响,以重组丙氨酸脱氢酶的酶活为响应值,运用 Design-Expert 软件建立回归模型,确定最佳的产酶条件,对模型拟合方程进行验证。

2 结果和分析

2.1 *ald* 基因序列分析

将 *A. ureafaciens* CZ31 的 *ald* 基因 PCR 产物回收纯化后测序,并将序列提交至 GenBank (GenBank: KC213816),结果表明 *ald* 基因的开放阅读框长度为 1119 bp,推测该基因编码由 372 个氨基酸残基组成的分子量为 40 kDa 的蛋白。对 *Arthrobacter* 属的 AlaDH 氨基酸序列相似性进行了分析,选择同属的 6 个种,采用 DNAMAN 软件对属内的同源性进行比对分析,结果显示属内种有高达 97.31% 以上的相似性,表明 *Arthrobacter* 属内的丙氨酸脱氢酶具有很高的同源性。在 NCBI Protein

Blast 数据库输入 CZ31 的 AlaDH 氨基酸序列进行比对, 选择相近菌种的序列, 采用 Clustal X 和 MEGA 5.0 软件构建系统进化树(图 1), 对 AlaDH 蛋白氨基酸序列在进化上的关系进行分析, 发现 CZ31 与 *A. aureescens* TC1 亲源关系最近, 序列同源率为 98%。以 *Mycobacterium tuberculosis* 2vhw.1 中的 *ald* 基因序列作为模板进行蛋白分子三维建模, 发现 *A. ureafaciens* CZ31 丙氨酸脱氢酶是一个同源六聚体, 外形呈桶状。每个亚基由 2 个相似的结构域组成, 结构域之间以 α 螺旋相连, 每个结构域含有 14 个 β 折叠和 16 个 α 螺旋, α 螺旋包裹在 β 折叠周围。

2.2 重组质粒的构建及转化

重组质粒与双酶切鉴定结果如图 2 所示, 初步说明目的基因成功导入 *E. coli* Rosetta, 以所提取的重组质粒为模板扩增目的基因 *ald*, PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司测序, 测序结果与原宿主菌 *A. ureafaciens* CZ31 *ald* 序列测序结果匹配度 100%, 进一步验证菌株 *A. ureafaciens* CZ31 的 *ald* 已成功导入 *E. coli* Rosetta 宿主菌, 将

该工程菌株命名为 *E. coli* CZR07。

2.3 重组酶的诱导表达及酶活检测

对粗酶液进行 SDS-PAGE 检测到约为 40 kDa 的目的蛋白, 酶活测定发现粗酶液具有较高的丙氨酸脱氢酶活性, 酶活为 (2.650 ± 0.012) U/mg (0.5 mmol/LIPTG, 30 °C 诱导 8 h), 经镍柱纯化后 SDS-PAGE 检测到纯度较高的目的条带(图 3), 说明 *ald* 在 CZR07 中成功表达。

2.4 重组酶诱导条件的响应面实验

对 CZR07 中目的基因 *ald* 表达的发酵诱导条件进行单因素实验, 选取发酵诱导条件中影响显著的 3 个因素温度、诱导时间及 IPTG 浓度, 以酶酶活为纵坐标作条形图(图 4)。实验结果显示, 当诱导温度为 20 °C 时, 重组酶 AlaDH 的酶活最高, 随着诱导温度的逐渐升高, 酶活下降。最佳诱导温度为 15–25 °C (图 4-A)。该实验结果表明, 温度较高时, 菌体合成蛋白的速率较高, 推测多肽链的过量积累容易造成多肽链无法正确折叠, 进而形成没有活性的包涵体。低温状态下, 目标蛋白的合成速率相对较低, 菌体内部有足够多的时间

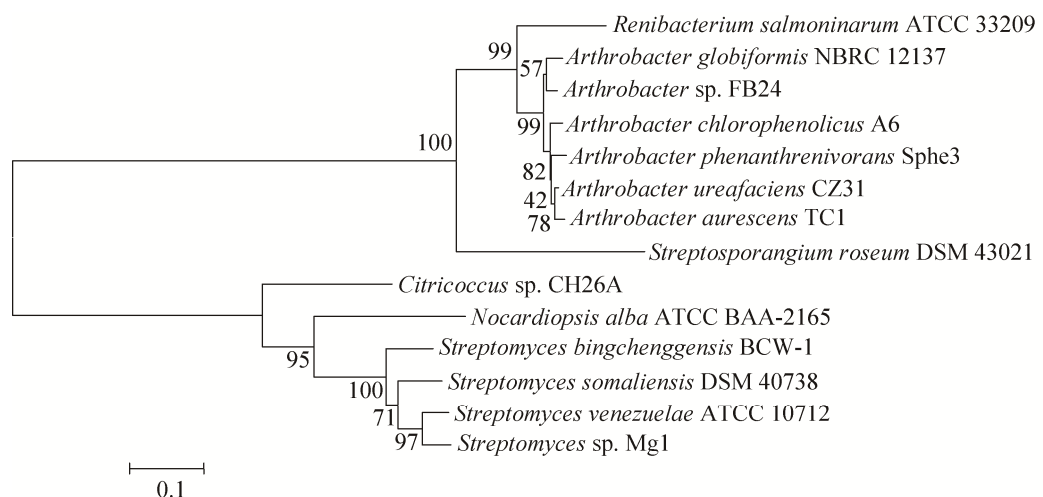


图 1. *AuAlaDH* 系统进化树分析

Figure 1. Phylogenetic tree based on *ald* gene sequence (1119 bp) of *A. ureafaciens* CZ31 strain and reference strains. The numbers at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

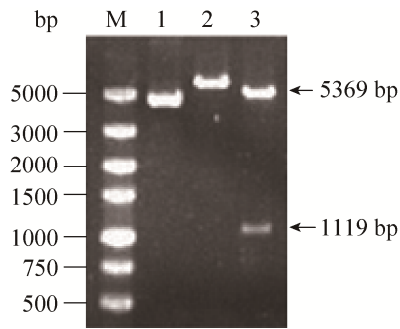


图 2. pET28a-ald 构建与酶切鉴定图

Figure 2. The plasmid of pET28a-ald identified by restriction endonuclease analysis. M: DNA marker; lane 1: pET28a; lane 2: pET28a-ald; lane 3: pET28a-ald digested by *Bam*H I and *Hind* III.

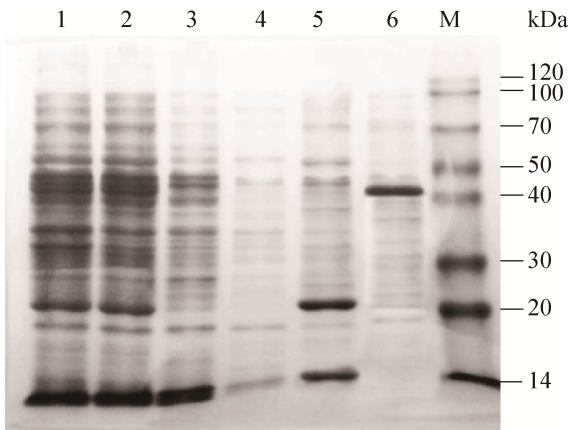


图 3. 表达产物经镍柱纯化后的 SDS-PAGE 检测结果
Figure 3. SDS-PAGE result of expression products purified by Ni column. Lane 1: lysing solution; lane 2: supernatant; lane 3: flow through solution; lane 4-5: washing buffer; lane 6: elution buffer; M: marker.

和空间让多肽链进行折叠, 使得 AlaDH 有较高的酶活。IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时, 重组酶 AlaDH 的酶活最高, 最佳 IPTG 浓度为 0.4–0.8 mmol/L(图 4-B)。实验结果说明 IPTG 对细胞有毒性, 过高会抑制菌体生长, 进而抑制蛋白的表达。只有合适的 IPTG 浓度才能使启动子完全开放, 更好地表达外源蛋白。诱导时间实验结果显示, 随着诱导时间的增长, 重组酶 AlaDH 酶活不断增加, 9 h 后

酶活基本维持稳定。最佳诱导时间为 5–9 h (图 4-C)。说明诱导时间较短时, 诱导剂还未发挥作用启动转录且菌体量少导致产酶量少, 酶活低; 诱导时间变长时, 菌体进入衰亡期产酶速率下降。

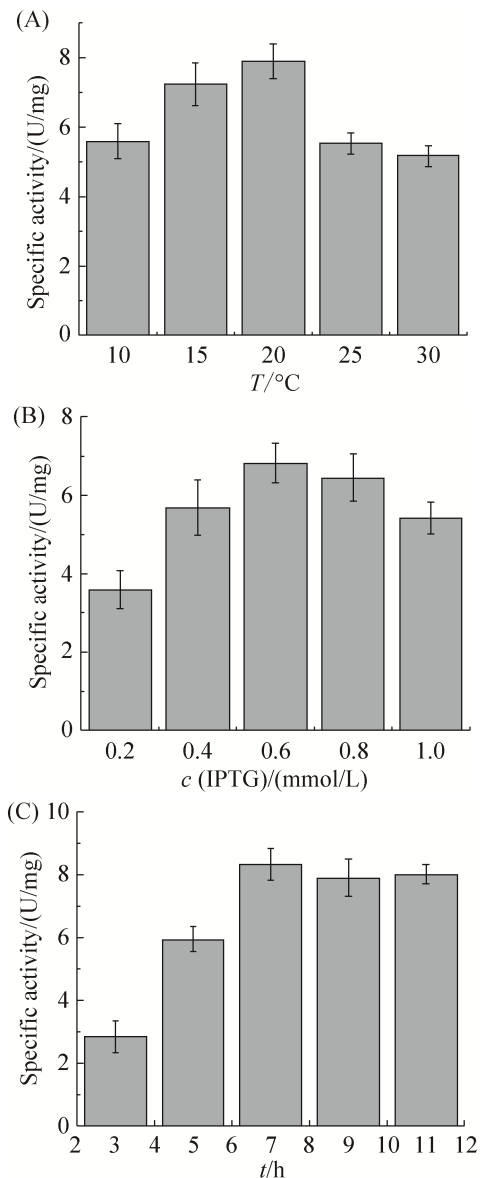


图 4. 单因素分析结果

Figure 4. Result of single factor analysis. A: Effect of temperature on specific activity; B: Effect of IPTG concentration on specific activity; C: Effect of induction time on specific activity. The standard deviation reflects the dispersion degree of the value relative to the average.

通过单因素实验确定了各因素的最佳值范围, BBD 实验在单因素实验基础上每个因素设置 3 个水平: 诱导温度(15、20、25 °C)、IPTG 浓度(0.4、0.6、0.8 mmol/L)、诱导时间(5、7、9 h),

数据见表 2, 响应面方差分析显著性检验结果见表 3。从 BBD 实验结果可以发现上述 3 个因子对 CZR07 产酶具有显著影响的因子为 IPTG 浓度 ($P=0.007$)和温度($P=0.0204$), 诱导时间(C)对重组

表 2. BBD 设计和响应值
Table 2. BBD design and response values

Number	$T/^\circ\text{C}$	c (IPTG)/(mmol/L)	t/h	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)
1	25	0.4	7	2.917±0.031	10.227±0.003
2	20	0.6	7	2.357±0.022	16.243±0.010
3	15	0.8	5	2.974±0.032	10.411±0.012
4	15	0.6	9	3.591±0.011	7.978±0.015
5	15	0.4	7	3.240±0.043	4.813±0.032
6	25	0.6	9	2.769±0.031	10.719±0.025
7	15	0.8	7	2.471±0.022	12.032±0.013
8	15	0.6	5	2.374±0.051	6.966±0.016
9	20	0.6	7	3.420±0.043	12.032±0.023
10	25	0.8	7	2.614±0.031	11.956±0.026
11	20	0.6	7	3.049±0.012	15.040±0.014
12	20	0.4	5	2.900±0.033	6.618±0.008
13	20	0.8	9	3.417±0.021	9.582±0.007
14	20	0.6	7	3.443±0.032	12.634±0.026
15	20	0.6	7	3.794±0.021	15.641±0.017
16	25	0.6	5	3.014±0.024	11.339±0.013
17	20	0.4	9	3.049±0.042	6.617±0.026

表 3. BBD 设计二次方模型方差分析
Table 3. Analysis of variance for Quadratic Model (Partial sum of squares - Type III)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P -value	Prob> F	Significant
Model	158.87	9	17.65	8.120	0.0058		Significant
A-Temperature/ $^\circ\text{C}$	19.38	1	19.38	8.910	0.0204		
B-IPTG concentration/(mmol/L)	30.38	1	30.83	14.180	0.0070		
C-Induction time/h	0.024	1	0.024	0.011	0.9196		
AB	7.53	1	7.53	3.460	0.1050		
AC	0.66	1	0.66	0.310	0.5975		
BC	0.17	1	0.17	0.079	0.7867		
A^2	13.78	1	13.78	6.330	0.0400		
B^2	31.89	1	31.89	14.660	0.0065		
C^2	44.72	1	44.72	20.560	0.0027		
Residual	15.22	7	2.17				
Lack of fit	1.18	3	0.39	0.110	0.9485		Not significant
Pure error	14.04	4	3.51				
Cor total	174.09	16					

酶产酶的影响不显著($P=0.9196$)。诱导时间、温度和 IPTG 浓度均为正效应,符合单因素筛选实验结果。

利用 Design-Expert 分析软件对表 2 中的数据进行多次多元回归拟合,得到酶活对诱导温度(A)、IPTG 浓度(B)、诱导时间(C)的二元多项回归方程(公式 1)。

$$\text{酶活}=14.32+1.56A+1.96B-0.055C-1.37AB-0.41AC-0.21BC-1.81A^2-2.75B^2-3.26C^2 \quad \text{公式(1)}$$

公式(1)中各系数反映的是各因素对响应值的影响程度,正负号代表着影响的效果(增加或降低),影响强度为 IPTG 浓度>温度>温度×IPTG 浓度>温度×诱导时间>IPTG 浓度×诱导时间>诱导时间。模型方差分析表明实验模型 Model=0.0058, significant, 模型回归显著;实验失拟项 Lack of Fit=0.9485, not significant, 模型的失拟项不显著,说明该方程对实验拟合较好。

2.5 CZR07 产酶诱导条件的响应面优化

由拟合的公式(1)得出的响应面三维图见图 5、6、7,分别表示了影响重组菌产酶 3 个因素间

的交互作用。等高线近似圆形说明二者交互作用不显著,椭圆形说明交互显著^[10],由实验结果可知温度和 IPTG 浓度、温度和诱导时间的交互作用不显著,而 IPTG 浓度和诱导时间的交互作用显著。对于模型方程,采用 Design-Expert 软件进行分析,求得曲面极值点(酶活 14.85 U/mg)对应的最佳培养条件为温度 21.65 °C、IPTG 浓度 0.66 mmol/L,诱导时间 6.92 h。考虑到实验操作的简便性,将诱导产酶条件改为温度 22 °C、IPTG 浓度 0.7 mmol/L、诱导时间 7 h,采用上述发酵条件进行 3 次重复验证实验,得出 CZR07 发酵产酶酶活平均值为 (15.23±0.025) U/mg,与预测值基本吻合,其相对误差为 2.58%。说明响应面分析法所得的诱导产酶条件准确可靠,可以用来预测 CZR07 发酵产酶情况。

从实验结果可以看出,优化后(0.7 mmol/L, 22 °C 诱导 7 h) CZR07 的 AlaDH 酶活性为 15.23 U/mg,比优化前(0.5 mmol/L IPTG, 30 °C 诱导 8 h)的活性提高了 5.75 倍,说明采用 BBD 设计对产酶的诱导条件进行优化获得了很好的优化效果,达到响应面优化的目的。

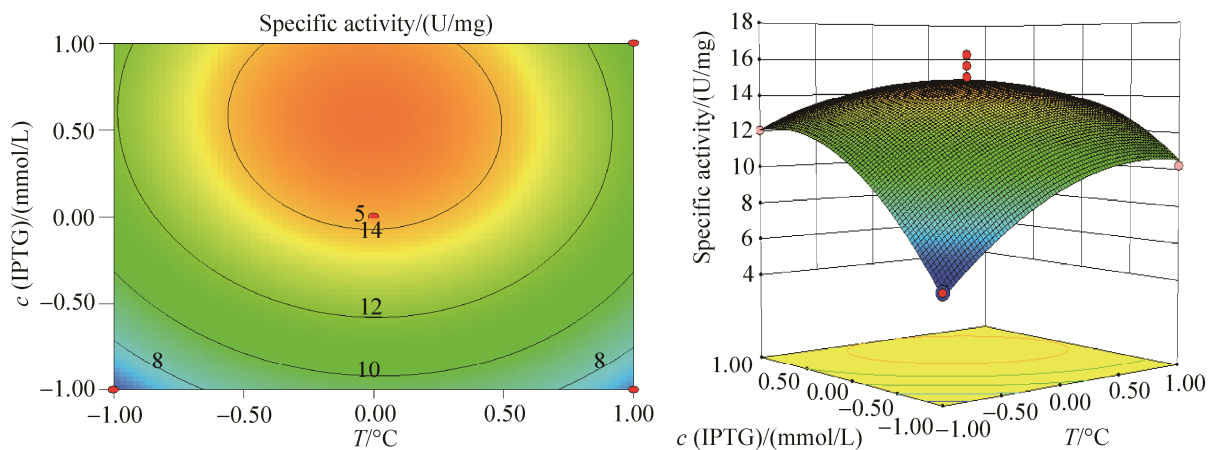


图 5. 温度和 IPTG 浓度对酶活交互影响的等高线和响应面图

Figure 5. Responsive surfaces (A) and contour plot (B) between temperature and IPTG concentration on specific activity.

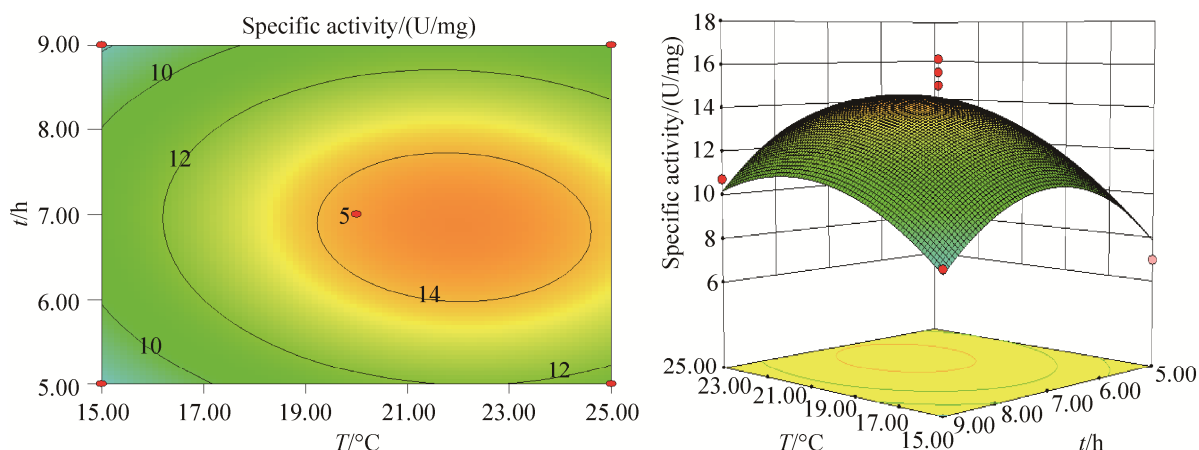


图 6. 温度和诱导时间对酶活交互影响的等高线和响应面图

Figure 6. Responsive surfaces (A) and contour plot (B) between temperature and induction time on specific activity.

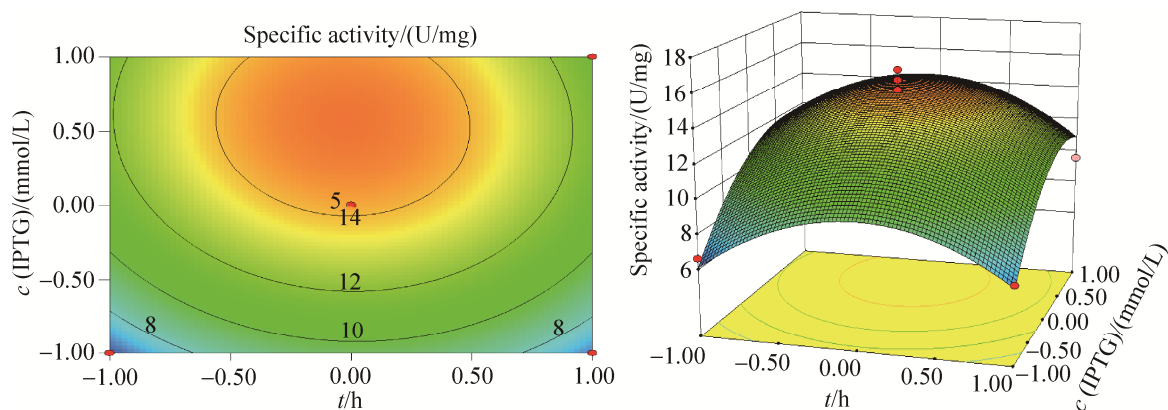


图 7. IPTG 浓度和诱导时间对酶活交互影响的等高线和响应面图

Figure 7. Responsive surfaces (A) and contour plot (B) between IPTG concentration and induction time on specific activity.

3 讨论

丙氨酸脱氢酶在 *A. ureafaciens* CZ31 高浓度氨同化中扮演十分重要的角色, 经序列分析和蛋白结构模拟发现该蛋白是一个同源六聚体, 在 *Arthrobacter* 属内具有高度同源性, 克隆至 *E. coli* Rosetta 并对其进行高效表达, 为后期进一步研究 AlaDH 的酶活特性及其铵离子存在条件下的表达

调控机制奠定基础。

响应面优化方法在生物领域主要用于微生物培养基成分和发酵条件的优化, 较少有文献对工程菌诱导条件进行优化。BBD 和 CCD 实验可以研究多个因素的交互影响, 对培养基成分进行 PB 筛选实验可以得到主要影响因子, 也可以选择最优碳源。Tanyildizi 等^[11]通过采用 CCD 响应面对枯草芽孢杆菌产 α -淀粉酶的培养基成分进行优

化, 大大降低了发酵生产成本。响应面实验分析葡萄糖跟橄榄油作为碳源对 *Candida cylindracea* 产脂肪酶的影响得到最佳碳源为橄榄油, 减短发酵时间, 节约发酵成本^[12]。Ye^[5]等将 *Bacillus subtilis* 中丙氨酸脱氢酶基因在 *Lactobacillus* 中异源表达, 并用来自 *Streptococcus thermophilus* 的 Idh 启动子促进 *Lactobacillus* 中丙氨酸脱氢酶的表达, 酶活为 48.3 U/mg。 *Enterobacter aerogenes* ICR0220 的 AlaDH 在 *E. coli* JM109 中进行原核表达酶活为 4.01 U/mg^[13]。对来自 *Phormidium lapideum* 的 AlaDH 进行 Blue-Sepharose 纯化后比活为 0.95 U/mg^[14]。本研究通过对工程菌 CZR07 产酶的 IPTG 诱导条件进行 BBD 实验设计得到 3 个主要诱导因素之间的交互影响, 得到了拟合公式, 并设计试验进行验证, 结果显示响应面优化诱导条件后 *A. ureafaciens* CZ31 中的 AlaDH 酶活显著提高达到 15.23 U/mg, 获得较好的优化效果, 实验结果与预测值相符, 本研究将克隆表达及诱导条件与响应面分析结合起来, 得到了高效生产目的蛋白的工程菌和较好的发酵诱导条件, 为后续研究有力的支持, 研究结果对于其他工程菌发酵过程的控制有较高的借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] Wen JJ. Expression, purification and crystallization of Ald and Ald K73A. Master Dissertation of Tianjin University of Science and Technology, 2014. (in Chinese)
温金金. 丙氨酸脱氢酶 Ald 及其突变体 AldK73A 的表达纯化及结晶. 天津科技大学硕士学位论文, 2014.
- [2] Tripathi SM, Ramachandran R. Crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen alanine dehydrogenase(Rv2780) in apo and ternary complex forms captures "open" and "closed" enzyme conformations. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, 2008, 72(3): 1089–1095.
- [3] Galkin A, Kulakova L, Ashida H, Sawa Y, Esaki N. Cold-Adapted alanine dehydrogenases from two antarctic bacterial strains: gene cloning, protein characterization, and comparison with mesophilic and thermophilic counterparts. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 4014–4020.
- [4] Jeong J, Baek EY, Kim SW, Choi JS, Oh JI. Regulation of the *ald* gene encoding alanine dehydrogenase by AldR in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(16): 3610–3620.
- [5] Ye W, Huo GC, Chen JL, Liu F, Yin JY, Yang LJ, Ma XL. Heterologous expression of the *Bacillus subtilis* (natto) alanine dehydrogenase in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis*. *Microbiological Research*, 2010, 165(4): 268–275.
- [6] Zhang XL, Jantama AK, Moore JC, Shanmugam KT, Ingram LO. Production of L-alanine by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 355–366.
- [7] Steinberg DM, Bursztyn D. Response surface methodology in biotechnology. *Quality Engineering*, 2010, 22(2): 78–87.
- [8] Deng ZP, Chen H, Chen SF. Medium optimization for nitrogen fixer *Paenibacillus* sp. 1–49. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(9): 1415–1425. (in Chinese)
邓志平, 陈浩, 陈三凤. 利用响应面法优化固氮类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp. 1–49 的发酵培养基. 微生物学报, 2016, 56(9): 1415–1425.
- [9] Zhang DL, Zhong W, Zhang C, Lv FX, Bie XM, Lu ZX. Optimization of conditions for lipoxygenase production from recombinant *Bacillus subtilis* by response surface methodology. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2012, 26(2): 324–329. (in Chinese)
章栋梁, 钟蔚, 张充, 吕凤霞, 别小妹, 陆兆新. 响应面法优化重组枯草芽孢杆菌产脂肪氧合酶条件. 核农学报, 2012, 26(2): 324–329.
- [10] Soliman M, Eldvasti A. Development of partial nitrification as a first step of nitrite shunt process in a Sequential Batch Reactor (SBR) using Ammonium Oxidizing Bacteria(AOB) controlled by mixing regime. *Bioresource Technology*, 2016, 221: 85–95.
- [11] Tanyildizi MS, Özer D, Elibol M. Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 2005, 40(7): 2291–2296.
- [12] Muralidhar RV, Chirumamila RR, Marchant R, Nigam P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 9(1): 17–23.
- [13] Chowdhury EK, Saitoh T, Nagata S, Ashiuchi M, Misono H. Alanine dehydrogenase from *Enterobacter aerogenes*: purification, characterization, and primary structure. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1998, 62(12): 2357–2363.
- [14] Sawa Y, Tani M, Murata K, Shibata H, Ochiai H. Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium, *Phormidium lapideum*. *Journal of Biochemistry*, 1994, 116(5): 995–1000.

Expression and production optimization of alanine dehydrogenase from *Arthrobacter ureafaciens* CZ31

You Wu¹, Wei Zhou^{1*}, Yaoyi Li², Tao Ruan¹, Zhonghua Yang^{1*}

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei Province, China

² Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] Alanine dehydrogenase gene (*ald*) of *Arthrobacter ureafaciens* CZ31 was cloned and transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) to construct engineering bacteria CZR07 with soluble expression of *ald*, and the conditions of alanine dehydrogenase (AlaDH) production were optimized. [Methods] Genomic DNA of *Arthrobacter ureafaciens* CZ31 was extracted; A pair of specific primers was designed to obtain the *ald* gene, and then subcloned into expression plasmid, pET-28a-*ald*, and expressed in *E. coli* Rosetta. The recombinant protein, AlaDH, was purified by Ni²⁺ chromatography. Response surface methodology was used to optimize fermentation conditions. [Results] The length of *ald* gene was 1119 bp, encoding 372 amino acid residues, molecular weight of the target protein was 40 kDa according to SDS-PAGE analysis. Specific enzyme activity of the recombinant enzyme was 2.65 U/mg. The optimal induction conditions were: 22 °C, isopropyl-β-D-thiogalactoside 0.7 mmol/L, induction time 8 h. The specific activity of the enzyme was 15.23 U/mg under optimized conditions, about 5.75 times of the initial. [Conclusion] We optimized the induction conditions of the recombinant enzyme production through Box-Behnken Design, and achieved the desired results, which provided a reference for the optimization of other genetic engineering bacteria.

Keywords: *Arthrobacter ureafaciens* CZ31, alanine dehydrogenase, cloning and expression, response surface optimization

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21376184) and by the Project Sponsored by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry

*Corresponding author. Wei Zhou, E-mail: zhouwei@wust.edu.cn; Zhonghua Yang, Tel/Fax: +86-27-86563448, E-mail: yangzh@wust.edu.cn

Received: 30 November 2016; Revised: 14 March 2017; Published online: 28 March 2017