



## 低温、嗜盐 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的克隆、表达及重组酶性质

薛毅<sup>1,2,3#</sup>, 王梅<sup>1,2,3#</sup>, 方泽民<sup>1,2,3</sup>, 房伟<sup>1,2,3\*</sup>, 肖亚中<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230601

<sup>2</sup>现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230601

<sup>3</sup>安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230601

**摘要:**【目的】从分离自北极海底沉积物 *Pseudoalteromonas* sp. K8 菌株克隆、重组表达  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3, 并研究其酶学性质。【方法】基于 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 基因组分析, 从亲缘关系较近的 *Pseudoalteromonas* sp. K8 克隆获得  $\alpha$ -淀粉酶基因 *amy3*, 以大肠杆菌为宿主进行重组表达, 经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化获得重组蛋白 Amy3。以可溶性淀粉等为底物, 研究 Amy3 的酶学性质。【结果】Amy3 最适催化 pH 为 8.5, 在 pH 6.5–10.0 范围内酶活力维持在 40% 以上; 其在 pH 7.5–8.5 范围的稳定性较好, pH 8.0 条件下的半衰期可达 4 h。Amy3 在低温下较稳定, 25 °C 半衰期为 5 h; 最适反应温度为 25 °C, 并且在 0 °C 可以保持 50% 以上酶活力, 显示良好的低温催化特性。NaCl 能够有效提升 Amy3 的酶活力及稳定性; 荧光光谱分析表明, NaCl 并未引起 Amy3 酶蛋白三级结构的改变。动力学分析显示, NaCl 影响了酶催化的  $K_m$  及  $k_{cat}$ , 进而提升了酶的催化效率。底物特异性分析表明, Amy3 对支链淀粉的水解能力优于直链淀粉, 并能够有效地水解小麦淀粉、玉米淀粉和木薯淀粉。【结论】来源于 *Pseudoalteromonas* sp. K8 菌株的  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 具有良好的低温催化及嗜盐性, 在洗涤、食品、污水处理等行业中有潜在的应用前景。

**关键词:**  $\alpha$ -淀粉酶, 低温催化, 嗜盐

$\alpha$ -淀粉酶(EC 3.2.1.1)能够随机切割淀粉分子内的  $\alpha$ -1,4 糖苷键, 生成糊精、低聚糖、葡萄糖等<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -淀粉酶是工业生产中应用最为广泛的酶制剂之一, 多以高温和中温淀粉酶为主。随着对  $\alpha$ -淀

粉酶应用要求的不断提升, 一些能满足某些极端工业要求、具备特殊催化性能的  $\alpha$ -淀粉酶成为人们关注的焦点<sup>[2-3]</sup>。

海洋具有高盐、高压、低温等极端环境, 海

基金项目: 国家自然科学基金(31570064); 安徽省高校省级自然科学基金项目(KJ2015A038)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-551-63861063; E-mail: fangahu@163.com

#共同第一作者。

收稿日期: 2017-04-06; 修回日期: 2017-06-14; 网络出版日期: 2017-11-21

洋微生物具有种群多样性、生理生化类群多样性、生态功能多样性、遗传特征多样性等特点, 其中蕴藏着不同于其他环境微生物来源的遗传资源<sup>[4]</sup>。目前, 已从 *Luteimonas* sp.<sup>[2]</sup>、*Zunongwangia* sp.<sup>[3]</sup>、*Pseudoalteromonas* sp.<sup>[5]</sup>、*Nocardiopsis* sp.<sup>[6]</sup>等海洋微生物中筛选获得多种  $\alpha$ -淀粉酶, 具备独特的催化性质, 如低温催化、盐耐受、良好的 pH 及温度稳定性等<sup>[7]</sup>。海洋  $\alpha$ -淀粉酶的这些独特的催化性质, 使其在诸多工业领域显示出重要的应用价值<sup>[7]</sup>。

*Pseudoalteromonas* sp. 微生物广泛分布于海洋环境, 从海底沉积物中已分离获得多株产胞外酶的该属微生物, 推测该种属微生物可能在海洋环境中担负了多种生态功能<sup>[8]</sup>。*Pseudoalteromonas* sp. K8 分离自北极 Kongsfjorden 海底沉积物, 与分离自南极海水的模式适冷菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 的亲缘关系较近<sup>[9]</sup>。基于 *P. haloplanktis* TAC125 基因组分析, 前期已从 *Pseudoalteromonas* sp. K8 成功克隆表达了淀粉水解相关酶 GH13 家族的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 PagI<sup>[9]</sup>和 GH97 家族的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶 PspAG97A<sup>[10]</sup>, 显示出独特的催化特性。进一步分析 *P. haloplanktis* TAC125 基因组获知, 基因组中 *pSHAa1357* 可能编码具有 maltose alpha-glucosidase 活性的酶蛋白。基于此分析, 本研究从 *Pseudoalteromonas* sp. K8 菌株克隆、异源表达了新型  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3, 酶学性质分析表明, Amy3 具有低温催化、嗜盐的优良特性, 在洗涤、食品、污水处理等行业中有潜在的应用前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

*Pseudoalteromonas* sp. K8 为实验室前期从北

极 Kongsfjorden 海底沉积物筛选获得; 大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 感受态细胞及 pEASY-T3 载体购自北京全式金生物技术有限公司; 表达载体 pET-22b(+) 为本实验室保存。 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -环糊精购于上海生工生物公司, 支链淀粉、直链淀粉购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。小麦淀粉、玉米淀粉及木薯淀粉购自上海禾煜贸易有限公司, 其他试剂为国药国产分析纯。

### 1.2 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的克隆及序列分析

基于 *P. haloplanktis* TAC125 基因组序列分析, 以 *pSHAa1357* 为参照, 设计上游引物 5'-CATA TGCCATCAACAAATACTAACACTA-3' (下划线为 *Nde* I 酶切位点), 下游引物 5'-CTCGAGCAGTGT GTTATTTAGTA-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点), 以 *Pseudoalteromonas* sp. K8 基因组为模板扩增目的基因, PCR 产物连接 pEASY-T3 载体后转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 筛选阳性克隆并测序验证序列正确性。以 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切阳性克隆, 并连接至 pET-22b(+) 表达载体, 构建重组质粒 pET-22b(+)-*amy3*, 转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。

在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 采用 BLAST 检索与 Amy3 序列一致性较高的  $\alpha$ -淀粉酶序列。采用 ClustalX 以及 Genedoc 软件, 对 Amy3 与部分已知  $\alpha$ -淀粉酶序列进行全序列比对分析。

### 1.3 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的重组表达及纯化

将含有 pET-22b(+)-*amy3* 表达载体的 *E. coli* BL21 (DE3) 培养至  $OD_{600}$  为 0.6, 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG, 16 °C 培养 16 h。以 6000 $\times$ g 离心 5 min 收集菌体, 使用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (含 500 mmol/L NaCl, pH 7.9) 重悬菌体, 超声破碎。

经超声破碎的菌体于 12000×g 离心 30 min, 收集上清。利用 Ni-NTA 柱亲和纯化蛋白, 纯化过程参照 Novagen 使用说明书, 纯化的蛋白利用 SDS-PAGE 检测纯度及分子量, 利用 Bradford 法测定蛋白含量。

#### 1.4 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的酶活测定

以 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)配制 2%可溶性淀粉, 沸水煮 5 min 使其糊化。将 250  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)与 300  $\mu$ L 2%可溶性淀粉混合均匀, 于 25 °C 孵育 3 min 后加入 50  $\mu$ L 适当稀释的酶液, 25 °C 反应 5 min。反应结束后, 加入 300  $\mu$ L 3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色液终止反应, 沸水浴 15 min, 迅速冰浴冷却, 离心取上清, 于 540 nm 测吸光值。酶活力单位定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量。

#### 1.5 pH 和温度对 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 酶活力的影响

以终浓度为 1%的可溶性淀粉为底物, 分别在 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$  缓冲液(pH 6.5–7.5), 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0), 50 mmol/L Gly-NaOH (pH 9.0–10)中测定酶活力, 以确定 Amy3 催化最适 pH。取适量的酶置于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–8.5), 于 25 °C 条件下孵育, 间隔时间取样测定酶活力, 以初始酶活力作为 100%, 计算相对酶活力, 以确定 pH 对酶稳定性的影响。

在 0–40 °C (间隔 5 °C)条件下, 测定不同反应温度对酶活力的影响, 其中在冰水混合物中测定 0 °C 条件下的酶活力。温度稳定性测定使用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5), 适当稀释的酶液, 在不同温度(15–25 °C, 间隔 5 °C)下保温, 间隔时间取样测定剩余酶活, 以初始酶活力为 100%, 计算相

对酶活力。

#### 1.6 金属离子对酶活力的影响

在反应体系中分别加入终浓度为 1 mmol/L 或 5 mmol/L 的  $\text{MgCl}_2$ 、 $\text{ZnCl}_2$ 、 $\text{MnCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{CoCl}_2$ 、 $\text{CuCl}_2$  溶液, 以及 0–3 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液, 以终浓度为 1%的可溶性淀粉为底物, 在最适条件下测定酶活力, 测定金属离子对酶活力的影响。

#### 1.7 盐对酶活力及稳定性的影响

分别在反应体系中加入 0–1.8 mol/L 的 NaCl 或 KCl 溶液, 以终浓度为 1%的可溶性淀粉为底物, 在最适条件下测定酶活力。在反应体系添加不同浓度 NaCl (0–2 mol/L), 于 25 °C 孵育, 间隔时间取样, 测定剩余酶活力, 确定 Amy3 在不同浓度 NaCl 存在时的稳定性。

#### 1.8 NaCl 对 Amy3 三级结构的影响

采用荧光光谱法检测不同浓度 NaCl 存在条件下, Amy3 酶蛋白三级结构的变化<sup>[10]</sup>。在不同浓度 NaCl 或 8 mol/L 尿素存在条件下, 采用 280 nm 激发波长, 检测 Amy3 酶蛋白的荧光光谱。相同条件下, 以仅含有不同浓度 NaCl 或者 8 mol/L 尿素的缓冲液作为对照。

#### 1.9 动力学分析

以可溶性淀粉为底物, 分别测定 0–1.5 mol/L NaCl 存在条件下 Amy3 酶蛋白的动力学参数。以 Origin 8.0 对数据进行拟合, 推算酶催化的  $K_m$  及  $V_{max}$ , 依据测定蛋白含量, 计算  $k_{cat}$  及催化效率 ( $k_{cat}/K_m$ )。

#### 1.10 底物特异性

用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)配制 2%可溶性淀粉、小麦淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、

直链淀粉、支链淀粉、普鲁兰糖、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精、糖原溶液, 沸水加热 5 min。建立 600  $\mu$ L 反应体系, 包括终浓度为 1% 的上述底物, 适当稀释的酶液, 250  $\mu$ L 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5), 于 25  $^{\circ}$ C 反应 5 min。反应结束后, 加入 300  $\mu$ L 3,5-二硝基水杨酸(DNS)显色液终止反应, 沸水浴 15 min 后迅速冰浴冷却, 离心取上清, 于 540 nm 测吸光值<sup>[11]</sup>。酶活力单位定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需要的酶量<sup>[11]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 克隆表达及序列分析

克隆获得的 *amy3* 全长 1656 bp, 编码的 Amy3 蛋白由 552 个氨基酸组成, SDS-PAGE 结果显示其分子量大约 65 kDa (图 1), 与基于氨基酸序列计算的理论分子量 63.9 kDa 相近。序列分析表明, Amy3 与来自海洋 *Pseudoalteromonas* sp. 的  $\alpha$ -淀粉酶一致性较高, 如 *Pseudoalteromonas translucida*

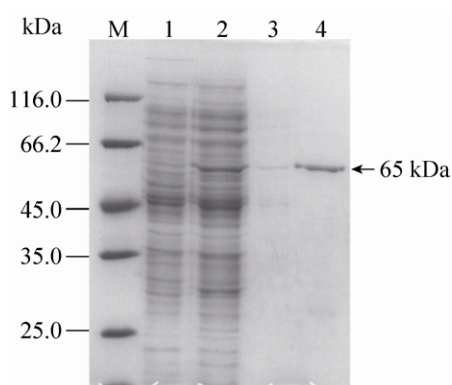


图 1. SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis for the overexpressed and Ni-NTA purified Amy3. M: protein marker; lane 1: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-22b(+) induced by IPTG; lane 2: *E. coli* BL21 (DE3)/pET-22b(+)-*amy3* induced by IPTG; lane 3: disrupted precipitation; lane 4: Ni-NTA purified Amy3.

(一致性 99%)、*Pseudoalteromonas* sp. M175 (一致性 99%)、*Pseudoalteromonas* sp. JB197 (一致性 86%) 等。但这些序列均来自全基因组测序, 没有进行系统的酶学性质研究。 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 分离自与 *P. haloplanctis* TAC125 亲缘关系较近的 *Pseudoalteromonas* sp. K8 菌株, 但与分离自南极微生物 *P. haloplanctis* A23 的  $\alpha$ -淀粉酶 AHA 的蛋白序列长度及组成差异较大<sup>[12]</sup>。

Amy3 含有  $\alpha$ -淀粉酶特有的 4 个保守区段, 保守区 II、IV 的 Asp 和保守区 III 的 Glu 为  $\alpha$ -淀粉酶参与催化的保守残基, 其中保守区 II 的 Asp 为可能的亲核试剂, 保守区 III 的 Glu 为可能的质子供体<sup>[13]</sup>。另外, 保守区段 I 和 IV 中还存在两个保守组氨酸残基(图 2)<sup>[13]</sup>。

### 2.2 pH 和温度对酶活力和稳定性的影响

$\alpha$ -淀粉酶 Amy3 最适催化 pH 为 8.5, 在 pH 6.5–10.0 范围内均能检测到酶活性, 酶活力维持在 40% 以上(图 3)。Amy3 在 pH 7.5–8.5 范围的稳定性较好, pH 8.0 时的稳定性最好, 半衰期可达到 4 h (图 4)。

$\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的最适反应温度为 25  $^{\circ}$ C, 并且在 0  $^{\circ}$ C 可以保持 50% 以上酶活力, 显示良好的低温催化特性(图 5)。与大多低温酶类似, Amy3 在低温下较稳定, 25  $^{\circ}$ C 半衰期为 5 h (图 6)。

### 2.3 金属离子对 Amy3 酶活力的影响

多数  $\alpha$ -淀粉酶都是  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的,  $\text{Ca}^{2+}$  可有效地提升酶活力及酶的稳定性<sup>[7]</sup>。研究发现, 在  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的  $\alpha$ -淀粉酶中,  $\text{Ca}^{2+}$  位于酶蛋白 2 个结构域之间的活性中心附近, 通过与相关氨基酸残基的作用以稳定结构域。当钙离子缺失时, 结构域移位, 酶蛋白稳定性降低; 且酶分子与底物的相互作用减弱, 影响了酶与底物结合能力<sup>[14]</sup>。但亦有

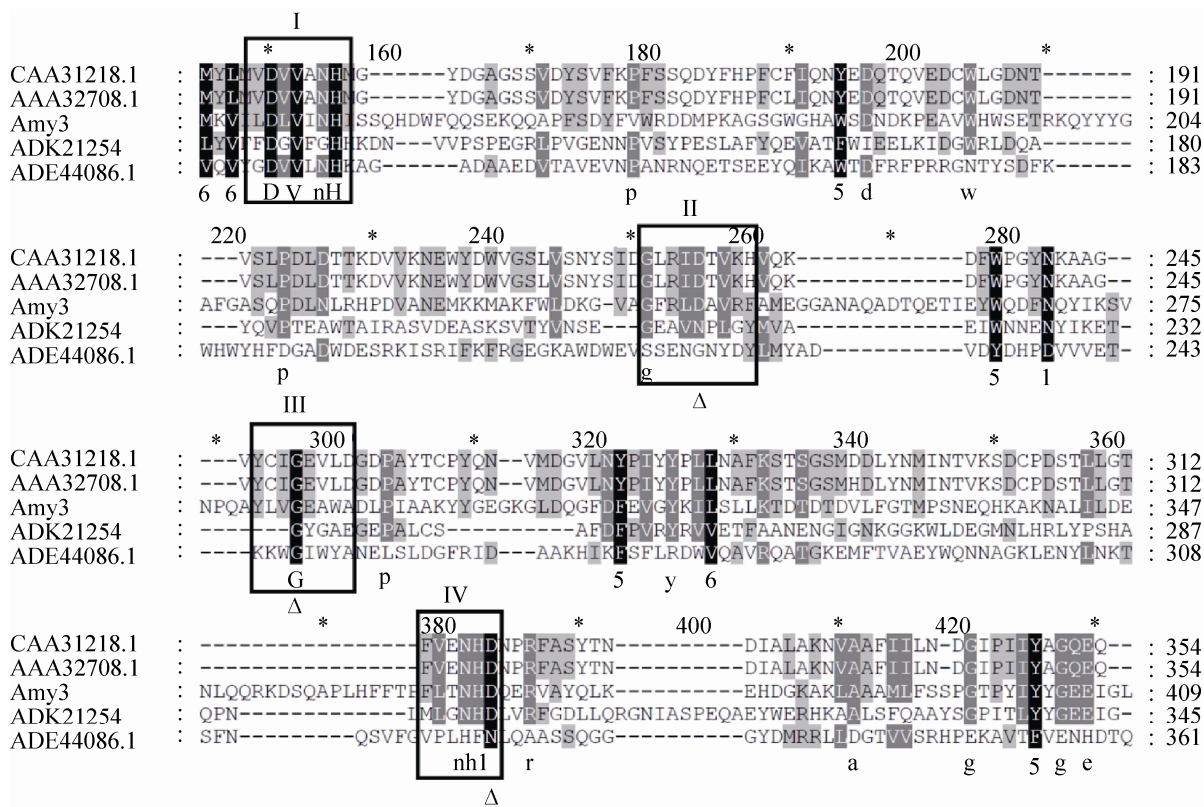


图 2.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 保守区分析

Figure 2. Multiple alignment of Amy3 with other known  $\alpha$ -amylases. CAA31218.1:  $\alpha$ -amylase from *Aspergillus oryzae*; AAA32708: Taka-amylase A (Taa-G1) from *Aspergillus oryzae*; ADK21254:  $\alpha$ -amylase from a marine metagenomic library; ADE44086.1:  $\alpha$ -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*; Amy3:  $\alpha$ -amylase in this study.  $\Delta$ : conserved amino acids important for catalysis.

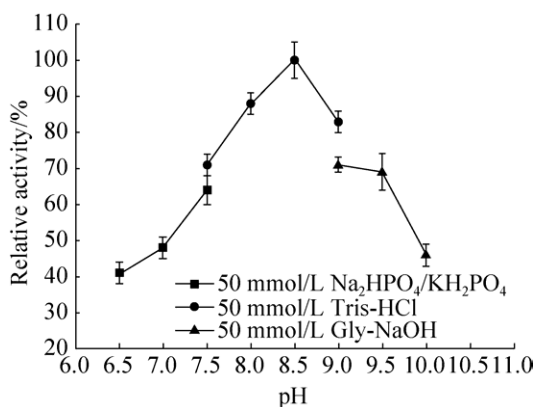


图 3.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的最适催化 pH

Figure 3. Optimum pH of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

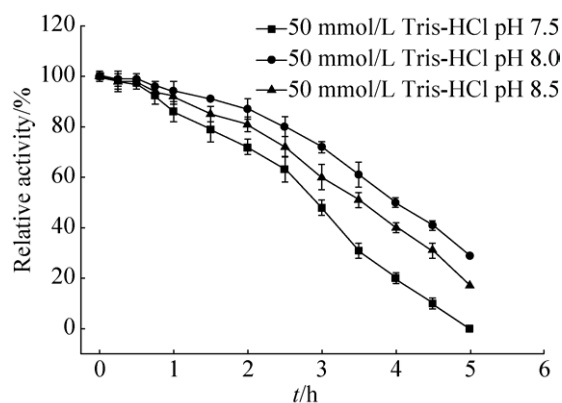


图 4.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的 pH 稳定性

Figure 4. pH stability of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

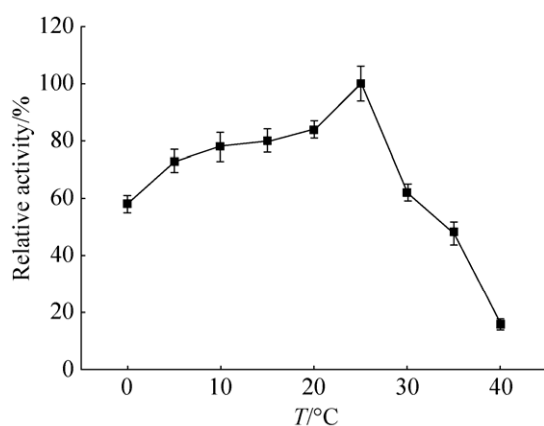


图 5.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 最适催化温度

Figure 5. Optimum temperature of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

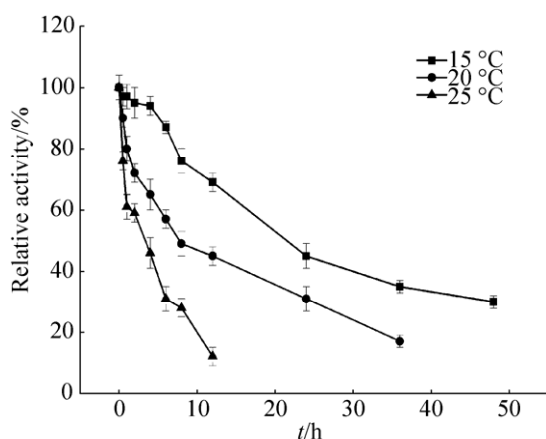


图 6.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的温度稳定性

Figure 6. Thermostability of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

$\text{Ca}^{2+}$ 不依赖的淀粉酶被报道,如来自海洋微生物 *Streptomyces strain A3*<sup>[15]</sup>和 *Bacillus thermooleovrans*<sup>[16]</sup>的  $\alpha$ -淀粉酶,  $\text{Ca}^{2+}$ 既不抑制也不促进  $\alpha$ -淀粉酶的酶活力。本研究中, 1.0 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ 可有效提升 Amy3 酶活至 300%以上,说明 Amy3 为典型的  $\text{Ca}^{2+}$ 依赖型  $\alpha$ -淀粉酶(图 7)。

$\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和  $\text{Cu}^{2+}$ 对 Amy3 酶活有抑制作用,  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 对该酶的酶活有促进作用(表 1)。

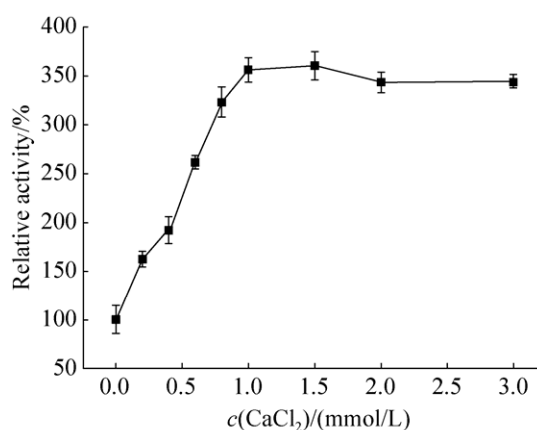


图 7.  $\text{Ca}^{2+}$ 对 Amy3 酶活力的影响

Figure 7. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on enzyme activity. The data presented are the average values from triplicate measurements.

表 1. 金属离子对酶活力的影响

Table 1. Effects of metal ions on enzyme activity

| Metal ions       | Relative activity/% |          |
|------------------|---------------------|----------|
|                  | 1 mmol/L            | 5 mmol/L |
| $\text{Zn}^{2+}$ | 14                  | 6        |
| $\text{Mn}^{2+}$ | 94                  | 32       |
| $\text{Fe}^{2+}$ | 134                 | 124      |
| $\text{Cu}^{2+}$ | 64                  | 31       |
| $\text{Fe}^{3+}$ | 127                 | 112      |
| $\text{Mg}^{2+}$ | 134                 | 118      |
| $\text{Co}^{2+}$ | 108                 | 13       |
| Control          | 100                 | 100      |

## 2.4 盐对酶活力及稳定性的影响

$\text{NaCl}$ 能都有效地促进 Amy3 的酶活力,并有效地提升酶的稳定性。800 mmol/L  $\text{NaCl}$ 能够提升 Amy3 酶活力至 5.88 U/mg,为不加  $\text{NaCl}$ 的 3.1 倍;  $\text{KCl}$ 同样可以促进酶活的提升,达到不加  $\text{KCl}$ 酶活的 1.69 倍(图 8)。另一方面,  $\text{NaCl}$ 能够有效地提升酶的稳定性,在 2 mol/L  $\text{NaCl}$ 存在条件下, Amy3 的温度稳定性得到有效提升, 25 °C 半衰期达到 80 h 以上,为不加  $\text{NaCl}$ 的 16 倍(图 9)。



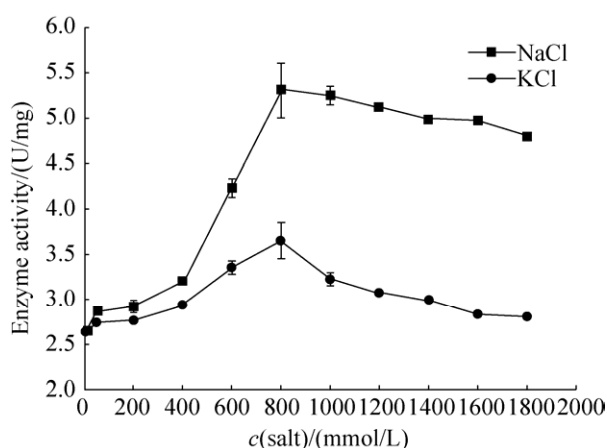


图 8. 盐对 Amy3 酶活力的影响

Figure 8. Effects of salt on enzyme activity of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

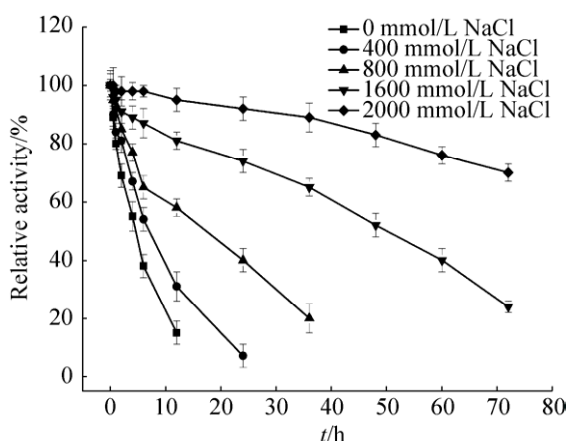


图 9. NaCl 对 Amy3 稳定性的影响

Figure 9. Effects of NaCl on thermostability of Amy3. The data presented are the average values from triplicate measurements.

## 2.5 NaCl 对 Amy3 酶蛋白三级结构的影响

为探究 NaCl 提升 Amy3 稳定性的机制, 采用荧光光谱检测 NaCl 存在条件下 Amy3 三级结构的变化<sup>[10]</sup>。在不同浓度 NaCl 条件下, 最大发射波长几乎不移动, 表示芳香族残基所在环境变化不大, 该结果表明, NaCl 不会造成 Amy3 酶蛋白三级结构的显著变化(图 10)。

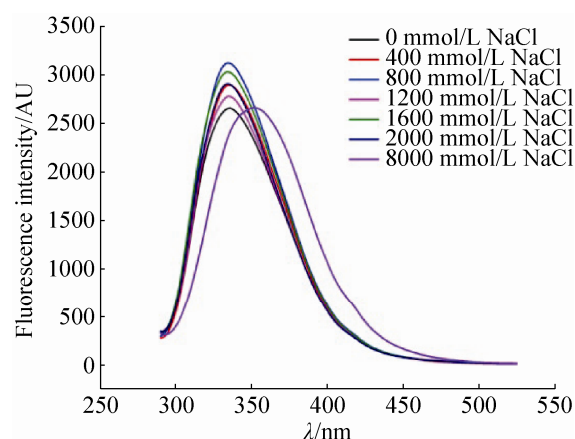


图 10. NaCl 对 Amy3 三级结构的影响

Figure 10. Effects of NaCl on tertiary structure of Amy3.

## 2.6 NaCl 对 Amy3 动力学参数的影响

以可溶性淀粉为底物, 测定 NaCl 对 Amy3 动力学参数的影响。动力学分析显示, NaCl 存在条件下, 催化反应的  $K_m$  降低,  $k_{cat}$  增加; 其中, 在 800 mmol/L NaCl 存在条件下, 酶催化的  $K_m$  最低, 催化效率  $k_{cat}/K_m$  最大, 表现为能够最有效地促进 Amy3 的酶活力(表 2)。

## 2.7 $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的比酶活及底物特异性

以可溶性淀粉为底物,  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 的比酶活为 13.92 U/mg, 与同属微生物 *Pseudoalteromonas arctica* GS230 的低温  $\alpha$ -淀粉酶酶活力相近<sup>[5]</sup>, 但低于 *Nocardiopsis* sp.<sup>[6]</sup>和 *Zunongwangia profunda*<sup>[3]</sup>等种属来源的  $\alpha$ -淀粉酶(表 3)。

表 2. NaCl 对 Amy3 酶催化动力学的影响

Table 2. Effects of NaCl on kinetic parameters of Amy3

| NaCl/<br>(mmol/L) | $K_m$ /<br>(mg/mL) | $V_{max}$ /<br>[mmol/(L·min)] | $k_{cat}$ /(s <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}/K_m$ /<br>[mL/(mg·s <sup>-1</sup> )] |
|-------------------|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|
| 0                 | 4.4152             | 0.39055                       | 0.248                         | $5.63 \times 10^{-2}$                         |
| 400               | 3.7973             | 0.44284                       | 0.281                         | $7.42 \times 10^{-2}$                         |
| 800               | 2.8966             | 0.59013                       | 0.375                         | 0.1295                                        |
| 1500              | 3.1057             | 0.50448                       | 0.321                         | 0.1033                                        |

表 3. 部分低温  $\alpha$ -淀粉酶酶活力比较  
Table 3. Specific activities of cold-active  $\alpha$ -amylases and Amy3

| Strains                                | Optimum temperature/ $^{\circ}\text{C}$ | Specific activity/(U/mg) | References |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|------------|
| <i>Clostridium perfringens</i>         | 30                                      | 34.6                     | [17]       |
| <i>Zunongwangia profunda</i>           | 35                                      | 270.6                    | [3]        |
| <i>Nocardiopsis</i> sp. 7326           | 35                                      | 548                      | [6]        |
| <i>Pseudoalteromonas arctica</i> GS230 | 30                                      | 25.5                     | [5]        |
| Amy3                                   | 25                                      | 13.92                    | This study |

Amy3 水解支链淀粉的相对酶活为 50% 以上, 优于直链淀粉(相对酶活 7.2%), 并且能够有效地水解小麦淀粉、玉米淀粉和木薯淀粉, 相对酶活为 90% 以上。由此分析推测, Amy3 偏好水解  $\alpha$ -1,6 键型的糖苷键(表 4)。Amy3 不能水解普鲁兰、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精, 对  $\alpha$ -环糊精和糖原的水解能力较弱。

表 4.  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 底物特异性  
Table 4. Substrate specificity of Amy3

| Substrate              | Specific activity/(U/mg) | Relative activity/% |
|------------------------|--------------------------|---------------------|
| Soluble starch         | 13.92                    | 70.1                |
| Wheat starch           | 19.85                    | 100.0               |
| Corn starch            | 19.31                    | 97.3                |
| Cassava starch         | 18.12                    | 91.7                |
| Amylose                | 1.42                     | 7.2                 |
| Amylopectin            | 10.20                    | 51.4                |
| $\alpha$ -Cyclodextrin | 0.77                     | 3.9                 |
| $\beta$ -Cyclodextrin  | 0                        | 0                   |
| $\gamma$ -Cyclodextrin | 0                        | 0                   |
| Pullulan               | 0                        | 0                   |
| Glycogen               | 1.55                     | 7.8                 |

### 3 讨论

大部分细菌来源的  $\alpha$ -淀粉酶的最适催化反应温度在 50–90  $^{\circ}\text{C}$ , 低于 50  $^{\circ}\text{C}$  时酶活力显著下降<sup>[18]</sup>。一些来自海洋微生物的  $\alpha$ -淀粉酶其催化最适温度多在 40–60  $^{\circ}\text{C}$  左右<sup>[7]</sup>。相比而言, 低温淀粉酶在低温条件下能有效催化生化反应, 展现出较高的酶活, 如来自海洋微生物 *Nocardiopsis* sp.  $\alpha$ -淀粉

酶<sup>[6]</sup>和 *Zunongwangia profunda* 的  $\alpha$ -淀粉酶 AmyZ<sup>[3]</sup>, *Pseudoalteromonas haloplanctis* A23 的  $\alpha$ -淀粉酶 AHA<sup>[12,19]</sup>, 以及本研究获得的  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3。

虽然低温淀粉酶能够有效地低温催化, 但是多数酶在 0  $^{\circ}\text{C}$  时的催化能力显著下降<sup>[3]</sup>, *Z. profunda* 的  $\alpha$ -淀粉酶 AmyZ 可保持 39% 的催化活力, *P. haloplanctis* A23 的  $\alpha$ -淀粉酶 AHA 可保持 20% 左右的酶活力。本研究中,  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 在 0  $^{\circ}\text{C}$  仍可以保持 50% 以上酶活力, 显示了良好的低温催化特性。

海洋环境的盐浓度约为 3.5% (约 0.6 mol/L) 或更高<sup>[20]</sup>, 定居其中的海洋微生物常表现出耐盐或者嗜盐的特性, 分离自耐盐或嗜盐微生物的酶在高盐浓度下可表现出良好的催化能力及稳定性<sup>[20–21]</sup>。Mevarech 等研究发现, 在 1–4 mol/L NaCl 或 KCl 存在条件下, 大多数嗜盐酶显示最佳催化效率及稳定性<sup>[22]</sup>。Amy3 为嗜盐  $\alpha$ -淀粉酶, NaCl 或 KCl 能够有效地提升 Amy3 的酶活力及稳定性, NaCl 存在条件下, 酶催化动力学  $K_m$  降低,  $k_{cat}$  增加, 说明 NaCl 的存在影响了酶对底物的亲和力和酶的转换数, 进而影响到酶的催化效率( $k_{cat}/K_m$ )。荧光光谱分析显示, NaCl 并没有通过改变 Amy3 的三级结构影响其酶活及稳定性。目前, 已有晶体结构解析的, 依赖 Cl<sup>-</sup> 依赖的  $\alpha$ -淀粉酶如来自人和猪胰腺的  $\alpha$ -淀粉酶<sup>[23–24]</sup>, 以及来自 *P. haloplanctis* A23 的  $\alpha$ -淀粉酶 AHA<sup>[25]</sup>, 晶体结构分析表明, 此



类  $\alpha$ -淀粉酶中存在 Cl<sup>-</sup>结合位点, 且 Cl<sup>-</sup>的结合位点相对保守, 对于酶催化的促进机制类似<sup>[23-25]</sup>。由此推测, Amy3 蛋白结构中可能亦存在 Cl<sup>-</sup>结合位点, Cl<sup>-</sup>虽不是催化反应必需的离子, 但可协助活性中心发挥最佳的催化活力<sup>[25]</sup>。

作为分离自海底沉积物微生物的  $\alpha$ -淀粉酶, 与其来源环境相适应, Amy3 在低温下展现出高活力, 并且在 0 °C 可保持 50% 以上的酶活力, 显示出优良的低温催化活力。另一方面, Amy3 酶蛋白具有嗜盐性, NaCl 等能够有效地提升酶活力及稳定性。以上表明,  $\alpha$ -淀粉酶 Amy3 是具有低温催化、嗜盐等优良性能的低温淀粉酶, 在洗涤、食品、污水处理等行业中都有潜在的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1599–1616.
- [2] Song QS, Wang Y, Yin C, Zhang XH. LaaA, a novel high-active alkalophilic alpha-amylase from deep-sea bacterium *Luteimonas abyssi* XH031<sup>T</sup>. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 90: 83–92.
- [3] Qin YJ, Huang ZQ, Liu ZD. A novel cold-active and salt-tolerant  $\alpha$ -amylase from marine bacterium *Zunongwangia profunda*: molecular cloning, heterologous expression and biochemical characterization. *Extremophiles*, 2014, 18(2): 271–281.
- [4] Yooshep S, Sutton G, Rusch DB, Halpern AL, Williamson SJ, Remington K, Eisen JA, Heidelberg KB, Manning G, Li WZ, Jaroszewski L, Cieplak P, Miller CS, Li WZ, Mashiyama ST, Joachimiak MP, van Belle C, Chandonia JM, Soergel DA, Zhai YF, Natarajan K, Lee S, Raphael BJ, Bafna V, Friedman R, Brenner SE, Godzik A, Eisenberg D, Dixon JE, Taylor SS, Strausberg RL, Frazier M, Venter JC. The *sorcerer II* global ocean sampling expedition: expanding the universe of protein families. *PLoS Biology*, 2007, 5(3): e16.
- [5] Lu MS, Wang SJ, Fang YW, Li HZ, Liu S, Liu HF. Cloning, expression, purification, and characterization of cold-adapted  $\alpha$ -amylase from *Pseudoalteromonas arctica* GS230. *The Protein Journal*, 2010, 29(8): 591–597.
- [6] Zhang JW, Zeng RY. Purification and characterization of a cold-adapted  $\alpha$ -amylase produced by *Nocardiosis* sp. 7326 isolated from Prydz Bay, Antarctic. *Marine Biotechnology*, 2008, 10(1): 75–82.
- [7] Homaei A, Ghanbarzadeh M, Monsef F. Biochemical features and kinetic properties of  $\alpha$ -amylases from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 83: 306–314.
- [8] Mi ZH, Yu ZC, Su HN, Wang L, Chen XL, Pang XH, Qin QL, Xie BB, Zhang XY, Zhou BC, Zhang YZ. Physiological and genetic analyses reveal a mechanistic insight into the multifaceted lifestyles of *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 adapted to the deep-sea sediment. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(10): 3795–3806.
- [9] Li W, Xue Y, Li JJ, Yuan J, Wang XT, Fang W, Fang ZM, Xiao YZ. A cold-adapted and glucose-stimulated type II  $\alpha$ -glucosidase from a deep-sea bacterium *Pseudoalteromonas* sp. K8. *Biotechnology Letters*, 2016, 38(2): 345–349.
- [10] Li W, Fan H, He C, Zhang XC, Wang XT, Yuan J, Fang ZM, Fang W, Xiao YZ. PspAG97A: a halophilic  $\alpha$ -glucosidase hydrolase with wide substrate specificity from glycoside hydrolase family 97. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(11): 1933–1942.
- [11] Liu Y, Lei Y, Zhang XC, Gao Y, Xiao YZ, Peng H. Identification and phylogenetic characterization of a new subfamily of  $\alpha$ -amylase enzymes from marine microorganisms. *Marine Biotechnology*, 2012, 14(3): 253–260.
- [12] Feller G, Lonhienne T, Deroanne C, Libioulle C, van Beeumen J, Gerday C. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile alpha-amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(8): 5217–5221.
- [13] MacGregor EA, Janeček Š, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2001, 1546(1): 1–20.
- [14] Buisson G, Duée E, Haser R, Payan F. Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *The EMBO Journal*, 1987, 6(13): 3909–3916.
- [15] Chakraborty S, Raut G, Khopade A, Mahadik K, Kokare C. Study on calcium ion independent  $\alpha$ -amylase from haloalkaliphilic marine *Streptomyces* strain A3. *Indian Journal of Biotechnology*, 2012, 11(4): 427–437.
- [16] Malhotra R, Noorwez SM, Satyanarayana T. Production and partial characterization of thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase of an extreme thermophile *Bacillus thermooleovorans* NP54. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 31(5): 378–384.
- [17] Shih NJ, Labbé RG. Purification and characterization of an extracellular alpha-amylase from *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(5): 1776–1779.
- [18] Ajayi AO, Fagade OE. Heat activation and stability of amylases from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6(10): 1181–1184.
- [19] Feller G, Payan F, Theys F, Qian MX, Haser R, Gerday C.

- Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 222(2): 441–447.
- [20] Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. *Marine Drugs*, 2010, 8(6): 1920–1934.
- [21] Hough DW, Danson MJ. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3(1): 39–46.
- [22] Boutaiba S, Bhatnagar T, Hacene H, Mitchell DA, Baratti JC. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp.. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, 41(1/2): 21–26.
- [23] Qian MX, Ajandouz EH, Payan F, Nahoum V. Molecular basis of the effects of chloride ion on the acid-base catalyst in the mechanism of pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Biochemistry*, 2005, 44(9): 3194–3201.
- [24] Maurus R, Begum A, Kuo HH, Racaza A, Numao S, Andersen C, Tams JW, Vind J, Overall CM, Withers SG, Brayer GD. Structural and mechanistic studies of chloride induced activation of human pancreatic  $\alpha$ -amylase. *Protein Science*, 2005, 14(3): 743–755.
- [25] Aghajari N, Feller G, Gerday C, Haser R. Structural basis of  $\alpha$ -amylase activation by chloride. *Protein Science*, 2002, 11(6): 1435–1441.

## Cloning and characterization of cold-active and salt-tolerant $\alpha$ -amylase Amy3 from *Pseudoalteromonas* sp. K8

Yi Xue<sup>1,2,3#</sup>, Mei Wang<sup>1,2,3#</sup>, Zemin Fang<sup>1,2,3</sup>, Wei Fang<sup>1,2,3\*</sup>, Yazhong Xiao<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui Province, China

<sup>2</sup> Anhui Key Laboratory of Modern Bio-manufacture, Hefei 230601, Anhui Province, China

<sup>3</sup> Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230601, Anhui Province, China

**Abstract:** [Objective] The present study was to clone a novel alpha-amylase from marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. K8 isolated from the sediment of Kongsfjorden and characterize the enzyme. [Methods] We cloned a cold-active and salt-tolerant  $\alpha$ -amylase Amy3, from *Pseudoalteromonas* sp. K8. The protein was expressed in *Escherichia coli*, purified by Ni-NTA and characterized. [Results] Using soluble starch as substrate, the optimum pH of Amy3 was about pH 8.5, and more than 40% of the maximal activity maintained in the pH range of 6.5 to 10. Amy3 showed the maximum activity at 25 °C, and retained more than 50% activity at 0 °C. It exhibited improved catalytic activity and thermostability in NaCl solution, with maximal activity occurring at 800 mmol/L NaCl/KCl, and more than 50% of maximal activity retained after incubation in 2 mol/L NaCl for 80 h at 25 °C. NaCl did not cause significant change of the global tertiary structure of Amy3, whereas influenced the catalysis efficiency. Amy3 hydrolyzed amylopectin preferentially, and could also hydrolyze wheat starch, corn starch and tapioca starch. [Conclusion] The results indicated that the alpha-amylase Amy3 is a cold-active and salt-tolerant  $\alpha$ -amylase with potential use in basic research and industry.

**Keywords:**  $\alpha$ -amylase, cold-active, salt-tolerant

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31570064) and by the Natural Science Foundation of the Department of Education of Anhui Province (KJ2015A038)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-63861063; E-mail: fangahu@163.com

#These authors contributed equally to this work.

Received: 6 April 2017; Revised: 14 June 2017; Published online: 21 November 2017