



## 嗜热子囊菌 *Thermoascus crustaceus* JCM12803 来源的低温 $\alpha$ -淀粉酶功能验证及其适冷机制分析

杨雄振<sup>1,2</sup>, 郭玉杰<sup>2</sup>, 涂涛<sup>2\*</sup>, 姚斌<sup>2</sup>, 罗会颖<sup>2</sup>, 缪礼鸿<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023

<sup>2</sup> 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

**摘要:**【目的】挖掘新颖的低温  $\alpha$ -淀粉酶基因资源, 并对其适冷机制进行分析, 可以加深我们对低温酶的认识并为酶分子改良提供科学依据。【方法】根据嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*) JCM12803 全基因组序列信息, 利用 PCR 的方法获得一个  $\alpha$ -淀粉酶基因 *Tcamy*, 将其插入至表达载体 pPIC9 后, 在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 中异源表达, 测定其酶学性质。同时采用氨基酸序列分析和同源建模的方法获得其三维结构, 分别从蛋白序列-结构-功能层面上研究其适冷机制。【结果】*TcAmy* 是一个典型的低温  $\alpha$ -淀粉酶, 最适温度 35 °C, 在 0 °C 下保持有 27% 的活性。序列和结构分析表明该酶 *N*-糖基化修饰程度低, Arg 和 Pro 含量低而 Gly 含量高且二硫键和离子键较少。【结论】本研究获得了一个低温  $\alpha$ -淀粉酶, 低 *N*-糖基化以及特殊的氨基酸组成和蛋白分子内作用力是其适应低温的根本原因。

**关键词:** 低温淀粉酶, 毕赤酵母, 同源建模, 适冷性

淀粉(starch)是植物通过光合作用而获得的碳水化合物, 广泛存在于小麦、玉米、水稻和马铃薯等重要经济农作物中<sup>[1]</sup>。作为葡萄糖的高聚体, 淀粉被水解到二糖阶段时为麦芽糖, 完全水解后得到葡萄糖。按照类型划分, 淀粉可分为直链型和支链型两种。前者主要是 D-葡萄糖基以  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接的多糖链, 而后者在直链淀粉的基础上, 还存在  $\alpha$ -1,6-糖苷键连接的分支, 结构比直链

淀粉复杂得多<sup>[2]</sup>。

淀粉酶(amylase)是一类能作用于淀粉、糖原、多糖衍生物中的糖苷键, 并把它们降解成较小分子化合物的酶的总称, 属于水解酶。作为最重要的工业酶之一, 淀粉酶在食品、发酵、制药、纺织品和造纸等行业都有着广泛的应用<sup>[3]</sup>。例如, 在烘焙行业中, 淀粉酶的添加改善面包的柔软性以及延缓面包老化<sup>[4]</sup>; 在啤酒酿造中, 淀粉酶的添加

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-41); 现代农业人才支撑计划

\*通信作者。Tel: +86-10-82106065; E-mail: 涂涛, tutao@caas.cn, 缪礼鸿, miaowhpu@126.com

收稿日期: 2018-01-23; 修回日期: 2018-04-11; 网络出版日期: 2018-07-16

可让麦芽快速液化,增加发酵中的糖含量,提高酿酒的效率<sup>[5]</sup>;在洗涤剂行业中,淀粉酶的添加可有助于分解淀粉类污垢,大大提高各类污垢的去除率<sup>[2]</sup>。相比植物和动物来源的淀粉酶而言,微生物来源的淀粉酶由于其稳定性和经济可行性,有着潜在的应用前景<sup>[6]</sup>。

根据已有的淀粉酶氨基酸序列查找同源性,大多数属于糖苷水解酶第 13 家族<sup>[7]</sup>。它们有一些共同特点:(1) 专一水解  $\alpha$ -1,4-糖苷键形成单糖或者低聚糖;(2) 具有一个 $(\beta/\alpha)_8$ 或 TIM 桶状结构<sup>[5]</sup>;(3) 一级序列中存在 4 个高度保守的区域,其中包含有形成催化位点的氨基酸,以及形成保守的 TIM 桶状拓扑结构的必需氨基酸<sup>[8]</sup>。根据淀粉酶作用方式的不同分为内切淀粉酶(endo-amylase)和外切淀粉酶(exo-amylase),其中  $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase, EC 3.2.1.1)属于典型的内切淀粉酶,能随机切割直链淀粉和支链淀粉内部的  $\alpha$ -1,4-糖苷键<sup>[9]</sup>。按来源也可分为真菌淀粉酶、细菌淀粉酶、动物以及植物淀粉酶。根据淀粉酶催化活性的最适作用温度不同,可将淀粉酶分为低温、中温和高温淀粉酶。低温淀粉酶是相对于高温淀粉酶而言的一种命名,目前市面上绝大多数的  $\alpha$ -淀粉酶为高温或中温酶,其最适作用温度通常为 50–65 °C。与中高温淀粉酶相比,低温淀粉酶在低温下具有较高的催化活性,在工业生产所需能量消耗更低,在生物技术和工业应用中具有广泛的吸引力<sup>[10]</sup>。尽管比利时学者 Feller 等从河豚毒素交替单胞菌(*Alteromonas haloplanctis*) A23 中分离的低温  $\alpha$ -淀粉酶在结构与功能关系上有了较为深入的研究和报道<sup>[11]</sup>,但是,目前已报道的产低温淀粉酶的菌株生产能力都不足以满足工业应用的要求。因此利用现代生物技术快速有效地获得新颖低温淀粉酶的基因资源,是解决上述问题的有效方法

之一。

在本研究中,我们从嗜热子囊菌(*Thermoascus crustaceus*) JCM12803 中克隆得到了一个新的低温淀粉酶基因 *Tcamy* 构建了高效表达的毕赤酵母基因工程菌株,并对其酶学性质进行系统的研究,以期获得工业应用的性质优良的低温淀粉酶,为在生物工程等高新技术领域中解决现代能源危机提供素材。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株与质粒:**嗜热子囊菌(*T. crustaceus*) JCM12803 购自日本微生物保藏中心;巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 和质粒 pPIC9 为本实验室保存;克隆菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) Trans-T1 和质粒 pEASY-T3 购自北京全式金公司。

**1.1.2 培养基:**LB 液体培养基(g/L):酵母浸提物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10。LB 固体培养基(g/L):酵母浸提物 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 10, 琼脂粉 15。MD 固体培养基(g/L):葡萄糖 20, 琼脂糖 20, YNB 13.4, 生物素 0.004。BMGY 培养基(g/L):酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 1%甘油, YNB 13.4, 生物素 0.004。BMMY 培养基(g/L):酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 0.5%无水甲醇, YNB 13.4, 生物素 0.004。YPD 培养基(g/L):葡萄糖 20, 酵母提取物 10, 蛋白胨 20。

**1.1.3 试剂及仪器:**直链淀粉购自 Sigma 公司;真菌 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒及 DNA 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;真菌 RNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 购自 TaKaRa 公司;FastPfu DNA 聚合酶购自北京全式金公司。其他试剂均为国产分析纯。

## 1.2 $\alpha$ -淀粉酶的酶活测定

$\alpha$ -淀粉酶的酶活测定方法采用 DNS (3,5-二硝基水杨酸)法<sup>[12]</sup>。将按 GB/T24401-2009 方法配制的 2%可溶性淀粉用相应 pH 缓冲溶液稀释至 1%终浓度淀粉溶液作为底物,测量体系包括 900  $\mu$ L 的底物和 100  $\mu$ L 适当稀释的酶液,在 35  $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 30 min,加入 1.5 mL 的 DNS 试剂终止反应后,置于沸水浴中处理 5 min,快速冷却至室温后取 250  $\mu$ L 混合液用酶标仪读取在波长 540 nm 下的吸光值,每组反应设置 1 个空白对照及 3 个平行。

酶活力计算公式:酶活力(U/mL) = 
$$\frac{2.623 \times \Delta OD + 0.292}{0.1 \times 30} \times N$$

其中: $\Delta OD$ 为 540 nm 下读取的吸光值减去空白对照的差值; $N$ 为酶液的稀释倍数。

酶活单位(U)定义:在一定条件下,每分钟水解可溶性淀粉生成 1  $\mu$ mol 葡萄糖所需的酶量为一个酶活单位。

## 1.3 $\alpha$ -淀粉酶基因 *Tcamy* 的克隆

嗜热子囊菌(*T. crustaceus*) JCM12803 的全基因组序列已由上海美吉公司完成测序。经过对注释序列进行生物信息学分析,*Tcamy* 是一个典型的  $\alpha$ -淀粉酶基因。通过美国国立生物技术信息中心 NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST 模块 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)评估该基因新颖性后,利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 Softberry (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)分别预测其信号肽序列和 *Tcamy* 基因的内含子和外显子。利用 Vector NTI Advance 10.0 软件分析 *Tcamy* 基因序列大小及理论蛋白分子量大小、等电

点。NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)预测成熟蛋白序列中 *N*-糖基化修饰位点。利用 ClustalW 软件和网站 ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)进行多序列比对分析。根据序列分析结果,设计用于 PCR 扩增  $\alpha$ -淀粉酶 *Tcamy* 基因成熟蛋白编码序列的引物 *Tcamy*-F :5'-TAGAATTCGCAACGCCTGCTCAATGGCGCT-3'; *Tcamy*-R :5'-TTCGCGGCCGCTTATTTCCCACAGATACCG-3' (下划线斜体代表酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I)。

为了获得  $\alpha$ -淀粉酶 *Tcamy* 基因的 cDNA 序列,将 *T. crustaceus* JCM12803 接种于 PDB 培养基中,30  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床振荡培养 3 d 后,以 2%接种量转接于以淀粉为唯一碳源的诱导培养基中,继续 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床振荡培养 3 d。用干净滤纸过滤菌液,收集菌体后,置于液氮中用研钵充分研磨,用 SV 总 RNA 纯化系统提取总 RNA,用反转录试剂盒 TOYOBO (Tokyo, Japan)合成 cDNA 单链。以 cDNA 为模板,用引物 *Tcamy*-F 和 *Tcamy*-R 进行 PCR 扩增,得到目的基因 *Tcamy*,将扩增后的 PCR 产物核酸电泳后回收,PCR 回收产物连接至克隆载体 pEASY-T3 上,将其转入克隆菌株 Trans-T1 后测序。

## 1.4 重组表达质粒的构建

测序正确的 *Tcamy* 基因和 pPIC9 质粒同时用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切,分别切胶回收片段和质粒,室温连接 2 h 后,转化至 *E. coli* Trans I 感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后涂布于氨苄抗性的 LB 平板,37  $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取单菌落进行菌落 PCR 验证之后,将条带大小正确的单克隆进一步测序验证,验证正确后提取重组质粒,该重组表达载体命名为 pPIC9-*Tcamy*。

## 1.5 重组表达载体在毕赤酵母中的异源表达及纯化

对重组表达载体 pPIC9-*Tcamy* 进行 *Bgl* II 单酶线性化处理之后, 电击转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 用 1 mol/L 山梨醇重悬后置于 30 °C 孵育 2 h 并涂布 MD 平板。在 30 °C 培养箱培养 2 d 后分别挑取 96 个明显单菌落于 3 mL BMGY 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 48 h 后转移菌体至 1.0 mL BMMY 诱导培养基中诱导培养 48 h。将获得的培养液于 4 °C、12000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 通过测量各个转化子粗酶液的酶活后, 挑选出活性最高、表达量最大的高效表达克隆子进行摇瓶放大培养。

将筛选得到的克隆子接种至 YPD 培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 48 h 后, 以 1% 接种量接种于 300 mL BMGY 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床振荡培养 48 h 后, 4500 r/min 离心 5 min 得到菌体, 更换成 150 mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY 液体培养基进行诱导培养 3 d, 诱导期间每 24 h 补加 1 次甲醇, 保证其终浓度为 0.5%。

待诱导培养结束后, 将发酵液于 12000 r/min 离心 10 min 收集上清液。先用 10 kDa 膜包浓缩粗酶液, 浓缩至约 10 倍体积后, 用 3 kDa 透析袋置于 pH 6.5、10 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中脱盐透析过夜处理。用平衡后的 HiTrap Q XL 阴离子柱纯化粗酶液, 并收集不同梯度洗脱下来的蛋白。A 液为 pH 6.5、10 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液, B 液在 A 液的基础上添加 1 mol/L NaCl。检测酶蛋白活性后进行 SDS-PAGE 分析其纯度, 采用 Endo H (New England Biolabs) 处理酶蛋白, 去除 *N*-糖基化修饰。选择其中最纯的酶液进行酶学性质分析。

## 1.6 重组酶 *TcAmy* 酶学性质的研究

**1.6.1 最适 pH 和 pH 稳定性的测定:** 纯化后的淀粉酶 *TcAmy* 在 35 °C、不同的 pH (pH 3.0–8.0, 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液) 的底物下进行酶促反应 30 min 以测定其最适 pH。将 *TcAmy* 在不同 pH 值 (pH 3.0–8.0) 的 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液中置于室温下处理 1 h, 再用 pH 5.0 的缓冲液作适当稀释, 并在 35 °C、pH 5.0 的条件下测定剩余酶活, 以未进行处理的酶活为 100% 对照, 用于研究重组 *TcAmy* 的 pH 稳定性。

**1.6.2 最适温度与温度稳定性的测定:** 用 pH 5.0 的缓冲液将纯化后的 *TcAmy* 稀释至适当的倍数后, 在不同温度下 (0–50 °C) 进行酶促反应 30 min 以确定其最适温度。将纯化后的 *TcAmy* 分别在 30 °C、35 °C 和 40 °C 下保温处理不同的时间, 在不同时间点取样后迅速置于冰上, 并在 35 °C、pH 5.0 的条件下测定剩余酶活性, 以未热处理的酶活为 100% 对照, 以研究 *TcAmy* 的热稳定性。

**1.6.3 底物特异性研究:** 将可溶性淀粉、玉米直链淀粉、玉米支链淀粉、糖原、生淀粉、麦芽糊精、玉米糊精、 $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精等底物分别溶解于 0.1 mmol/L pH 5.0 的缓冲液中, 终浓度为 5 mg/mL。加入适当稀释倍数的 *TcAmy*, 在 35 °C 下反应 30 min。采用 DNS 法测定各自的酶活力。

**1.6.4 不同金属离子及化学试剂对酶活力的影响:** 在酶促反应体系中加入各种金属离子及化学试剂 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ , SDS, EDTA 和  $\beta$ -巯基乙醇), 终浓度为 5 mmol/L, 在标准反应条件下测定酶活力, 以未加试剂的体系为对照组。每组 3 次重复。

## 1.7 动力学参数

分别配制最适 pH 下不同浓度的底物 (0.5–

10.0 mg/mL), 酶反应体系组成不变, 但是酶反应时间减半至 15 min。分别在最适条件下测定酶活力大小, 利用 GraphPad Prism 软件分析得到 *TcAmy* 以可溶性淀粉为底物时的  $V_{\max}$  和  $K_m$  值。

## 1.8 同源建模

为了从分子层面了解 *TcAmy* 的结构信息, 分析其可能的低温酶机制, 利用同源建模的方法构建了 *TcAmy* 的三维模型。以 *Aspergillus niger* 来源的  $\alpha$ -淀粉酶(PDB: 2GUY; 1.6Å, 序列一致性为 74%)为模板<sup>[13]</sup>, 利用 Discovery Studio 2017 软件进行三维结构的建模。对模型的结构评价, 采取的是 PROCHECK 和 Verify3D 两种经典的结构评估方法。盐桥通过 ESBRI 软件 (<http://bioinformatica.isa.cnr.it/ESBRI/>) 进行分析, 蛋白表面特性通过 POPS 软件进行分析<sup>[14]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\alpha$ -淀粉酶基因 *Tcamy* 的克隆及序列分析

分别以 *T. crustaceus* JCM12803 的基因组和 cDNA 单链为模板, 用引物 *Tcamy*-F 和 *Tcamy*-R 进行 PCR 扩增, 获得了  $\alpha$ -淀粉酶基因 *Tcamy* 的全长序列和 cDNA 序列。经过琼脂糖凝胶电泳和测序验证,  $\alpha$ -淀粉酶基因 *Tcamy* 的全长为 2167 bp, 含有 8 个内含子序列。cDNA 序列为 1482 bp, 编码 493 个氨基酸和 1 个终止密码子。基因 *Tcamy* 的相关信息提交至 GenBank 数据库中, 序列注册号为 MG815781。

经过序列分析, 其 N 端前 19 个氨基酸为可能的信号肽序列。成熟蛋白的理论分子量为 51.8 kDa, 等电点 4.37, 含有一个可能的 N-糖基化修饰位点 Asn216。 *TcAmy* 与 *Aspergillus fumigatus* 来源的  $\alpha$ -淀粉酶(KEY83532.1)序列一致性为 77%, 与已有

晶体结构的 *A. niger*  $\alpha$ -淀粉酶(2GUY)一致性为 74%。以 2GUY 为模板, 对 *TcAmy* 进行同源建模。通过模型评估分析, 在确保三维结构总体质量的合理性之后, 对 *TcAmy* 的结构特征进行分析。如图 1 所示, 与其他来源的  $\alpha$ -淀粉酶一样<sup>[13,15]</sup>, *TcAmy* 主要由 3 个结构域(domain)组成。Domain A 位于蛋白质的 N 端, 是由  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片交替连接形成的 TIM 桶状结构, 又称为  $\alpha$ -淀粉酶的催化中心; Domain B 穿插在 Domain A 中第 3 个  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠片之间; Domain C 位于蛋白质的 C 端, 由 8 个反向平行的  $\beta$  折叠片组成, 又称为 DUF 1996 结构域。在 Domain B 中, 存在 1 个保守的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点<sup>[13,16]</sup> 残基 Asn140、Glu181、Asp194 和 His229 与  $\text{Ca}^{2+}$  形成稳定的作用网络。

### 2.2 重组 $\alpha$ -淀粉酶的表达及纯化

构建的重组表达载体 pPIC9-*Tcamy* 在毕赤酵母 GS115 中成功地实现异源表达, 从 96 个转化子中挑选出酶活最高的一株进行摇瓶发酵诱导培养 48 h, 酶活为 12.84 U/mL。将得到的粗酶液用 10 kDa 膜包过滤浓缩以初步除去酶液中的盐分及其他小分子物质, 进一步用阴离子交换层析的两步法进行蛋白纯化, 经 SDS-PAGE 鉴定达到了蛋白电泳纯(图 2)。经过 Endo H 酶脱糖基处理之后, 蛋白条带有略微降低, 与理论计算分子量相一致, 为 51.8 kDa。 *TcAmy* 序列分析中预测其存在一个 N-糖基化修饰位点 Asn216, 说明 *TcAmy* 在毕赤酵母中表达时发生了较低程度的 N-糖基化修饰。

### 2.3 重组酶 *TcAmy* 酶学性质分析

绝大多数真菌来源的  $\alpha$ -淀粉酶最适 pH 都介于 4.0–7.0 之间。与 *Aspergillus oryzae* (pH 5.0)<sup>[17]</sup> 和 *Aspergillus awamori* (pH 4.8)<sup>[18]</sup> 来源的  $\alpha$ -淀粉酶最适 pH 相似, 重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 的最适 pH

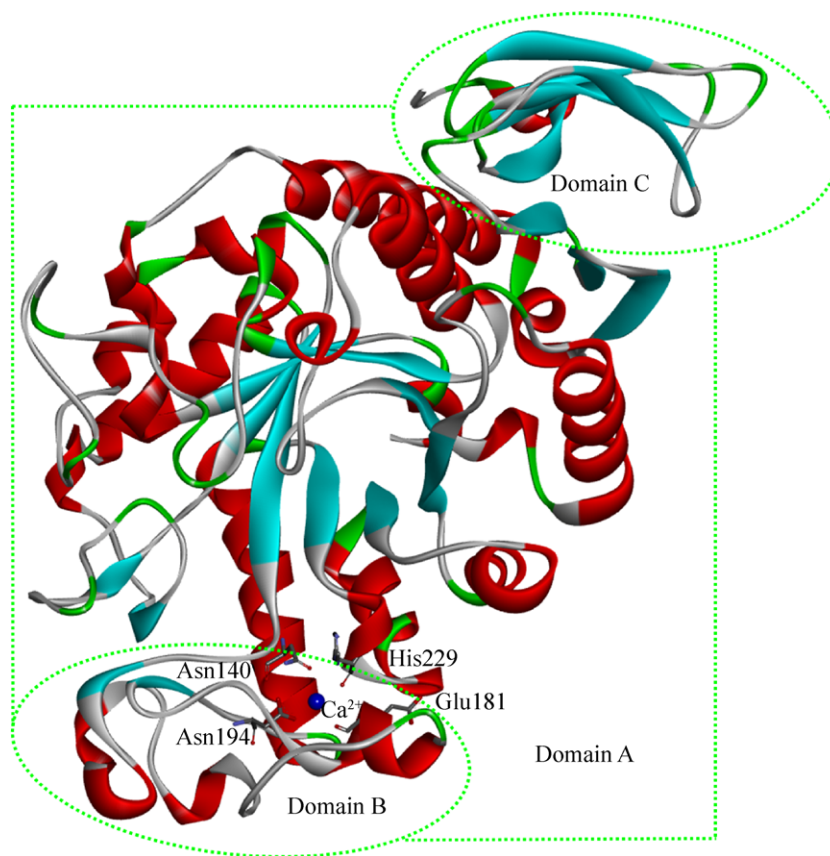


图 1. *TcAmy* 的模拟三维结构

Figure 1. Modeled structure of *TcAmy*.

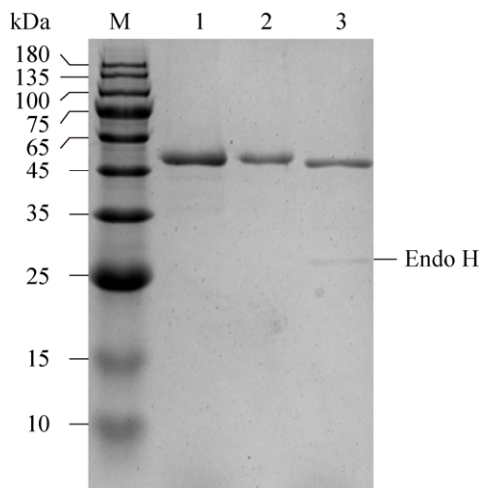


图 2. 纯化重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 的 SDS-PAGE 分析  
Figure 2. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant  $\alpha$ -amylase *TcAmy*. M: the standard molecular weight; 1, 2: the purified *TcAmy*; 3: the purified *TcAmy* with Endo H treatment.

为 5.0 (图 3-A), 在 pH 4.0–7.0 之间保持有较高酶活, 在碱性环境下几乎完全失活。*TcAmy* 的 pH 稳定范围较宽(图 3-B), 在 pH 5.0–10.0 的条件下处理 1 h 后, 均能剩余 60% 以上的酶活性, 说明 *TcAmy* 在弱酸至碱性环境中均表现出很强的稳定性。

与目前报道的大多数真菌来源的  $\alpha$ -淀粉酶不同, 重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 是一个典型的低温淀粉酶, 最适温度为 35 °C (图 3-C)。当酶促反应温度超过 40 °C 时, 酶活力骤降; 在 20 °C 下显示出 60% 的酶活, 0 °C 下仍旧有 27% 的酶活。在热稳定性方面, *TcAmy* 也符合低温淀粉酶的特征 (图 3-D)。在 30 °C 下保温 30 min 后, 剩余 68% 的酶活; 当处理温度超过最适温度之后, 极易失活,

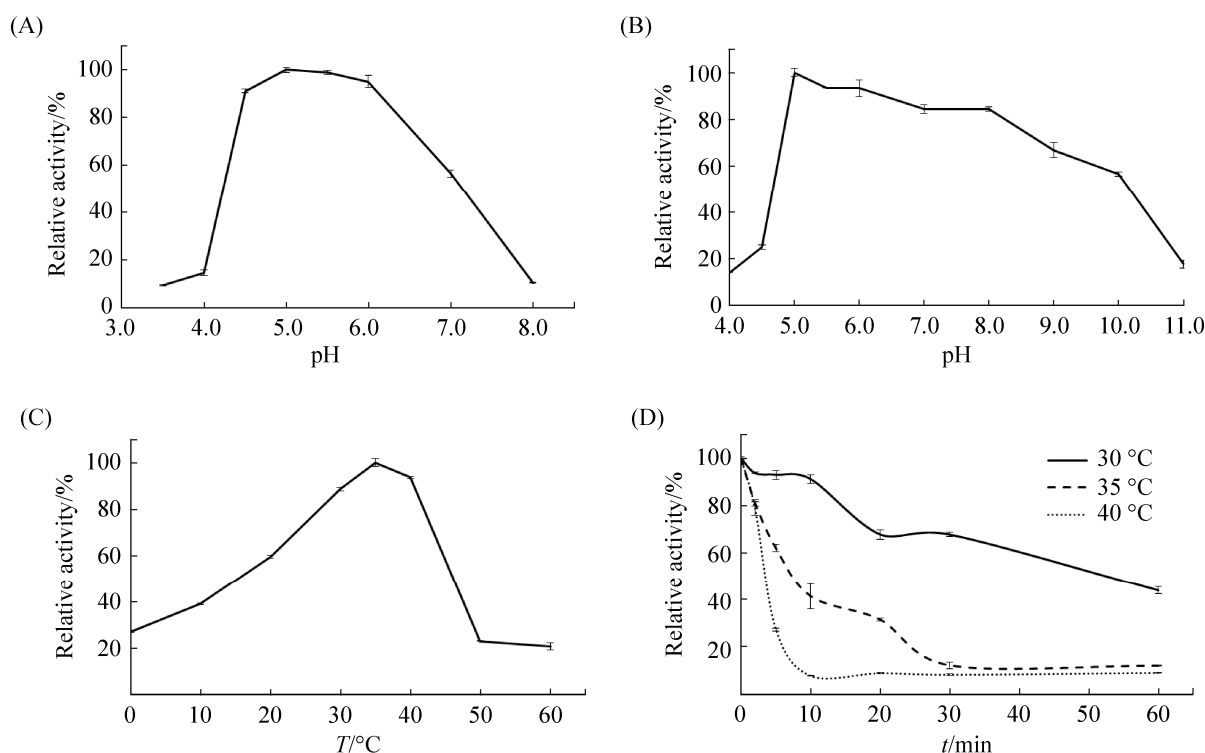


图 3. 纯化重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 的酶学性质

Figure 3. Characterization of the purified recombinant  $\alpha$ -amylase *TcAmy*. A: pH-activity profile; B: pH-stability profile; C: Temperature-activity profile; D: Temperature-stability profiles.

在 40 °C 下保温 10 min, 几乎完全丧失酶活性。如此低温酶的特性, 意味着重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 在化工和食品等行业有着良好的应用前景。

#### 2.4 金属离子及化学试剂对 *TcAmy* 的影响

大多数  $\alpha$ -淀粉酶都是金属依赖的酶蛋白。在酶促反应体系中加入 5 mmol/L 的金属离子或化学试剂, 研究其对 *TcAmy* 酶活的影响。如表 1 所示,  $\text{Fe}^{3+}$  对 *TcAmy* 有很强的抑制作用;  $\beta$ -巯基乙醇对 *TcAmy* 酶活有明显促进作用, 而  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Cr}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对 *TcAmy* 酶活有轻微促进作用。通常认为,  $\text{Ca}^{2+}$  是维持  $\alpha$ -淀粉酶结构稳定所必需的离子<sup>[19]</sup>。通过对 *TcAmy* 的三维结构分析, 我们发现 *TcAmy* 中存在一个保守的  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点, 这验证了  $\text{Ca}^{2+}$  对酶活的重要影响。在其他淀粉酶

中, 也有报道发现诸如  $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$  能够促进其酶活<sup>[16,20]</sup>, 推测是由于这些离子取代了  $\text{Ca}^{2+}$  而维持结构稳定。

#### 2.5 *TcAmy* 的底物特异性分析

重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 对可溶性淀粉有最高酶活, 将其定义为 100% 时, *TcAmy* 对于麦芽糊精和玉米糊精的酶活分别为 47.1% 和 35.4%, 对于  $\gamma$ -环糊精和  $\beta$ -环糊精的酶活分别为 9.5% 和 7.9%, 而以玉米支链淀粉、玉米直链淀粉、糖原、 $\alpha$ -环糊精和生淀粉为底物时, 未检测到活性。

#### 2.6 动力学常数测定

以可溶性淀粉作为底物, 在 35 °C、pH 5.0 的反应条件下, 重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 的比活为  $(281.1 \pm 20.3)$  U/mg。如图 4 所示, *TcAmy* 的  $K_m$  和

表 1. 不同金属离子及部分化学试剂对纯化重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 活性的影响Table 1. Effect of metal ions and chemical reagents (5 mmol/L) on the enzyme activity of purified recombinant *TcAmy*

Ions or chemicals	Relative activity/%	Ions or chemicals	Relative activity/%
Control	100.00 $\pm$ 0.97	—	—
K <sup>+</sup>	98.40	Cr <sup>3+</sup>	106.50
Mg <sup>2+</sup>	95.50	Co <sup>2+</sup>	114.20
Na <sup>+</sup>	102.20	Zn <sup>2+</sup>	101.30
Ca <sup>2+</sup>	107.20	Fe <sup>3+</sup>	9.57
Ni <sup>2+</sup>	98.30	$\beta$ -Mercaptoethanol	133.50
Ag <sup>+</sup>	93.24	EDTA	83.80
Mn <sup>2+</sup>	101.60	SDS	51.90

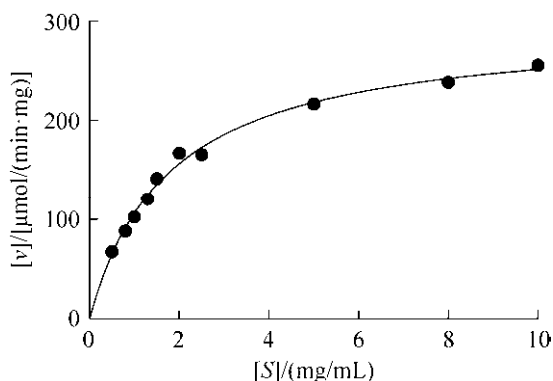


图 4. 米氏方程曲线

Figure 4. Kinetic parameters of *TcAmy* with soluble starch as the substrate.

$V_{\max}$  值分别为(1.79 $\pm$ 0.11) mg/mL、(296.0 $\pm$ 6.7)  $\mu$ mol/(min·mg)。进一步计算可得, *TcAmy* 的  $k_{\text{cat}}$  值为 255.5/s, 催化效率  $k_{\text{cat}}/K_m$  为 142.8 (mg·mL)/s。

### 3 讨论

目前工业上常见的淀粉酶一般都是中高温淀粉酶, 最适温度在 50 °C 以上, 它们在 0–30 °C 低温范围内酶活力较低。低温淀粉酶能在低温条件

下有着较高的催化效率, 因此在工业生产中可以节省大量能源, 使得其在食品加工业中有着相当广泛的应用前景。例如, 在面包烘焙加工中, 低温淀粉酶的添加不仅使得面粉团的发酵时间被缩短, 而且提高了面包瓤的质量, 改善了面包的柔软性。此外, 利用低温淀粉酶的热敏感特性, 可及时阻止酶的催化反应, 从而可维持面包瓤结构的稳定, 避免面包太软或太粘。本研究中获得的重组  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 是一个典型的低温酶, 在最适温度 35 °C 下的比活为 281.1 U/mg, 在 0 °C 下保持有 27% 的活性; 当热处理温度超过其最适温度之后, 酶活骤降。在 30 °C 下的酶活力, 要高于 *A. niger*<sup>[21]</sup> 来源的中温淀粉酶, 但低于 *Paecilomyces variotii*<sup>[22]</sup> 和 *Rhizopus oryzae*<sup>[23]</sup> 等种属来源的中温淀粉酶(表 2)。此外, *TcAmy* 有着较好的 pH 稳定性, 对除去 Fe<sup>3+</sup> 以外的金属离子和化学试剂不敏感, 这决定了 *TcAmy* 有着潜在的应用价值。以 *TcAmy* 为研究模型, 探讨其冷适应性机制, 一方面可加深我们对低温酶的认识, 另一方面可为后续工作中, 基于应用需求为指导的酶分子改良研究提供科学依据。



表 2. 低温  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 与其他真菌淀粉酶在 30 °C 下的酶活力比较  
Table 2. Comparison of the specific activity of *TcAmy* with other fungal  $\alpha$ -amylases at 30 °C

Strain	Optimum temperature /°C	Specific activity at 30 °C /(U/mg)	References
<i>Paecilomyces variotii</i>	60	367.5	[21]
<i>A. niger</i>	60	100.2	[22]
<i>Rhizopus oryzae</i>	50	505.4	[23]
<i>T. crustaceus</i>	35	238.9	This study

糖基化修饰是调节酶蛋白活性和稳定性的关键因素之一<sup>[24-25]</sup>。*TcAmy* 在毕赤酵母中异源表达时, 发生了轻微程度的 *N*-糖基化修饰。与大多数真菌来源的  $\alpha$ -淀粉酶相比, 如来源于 *Talaromyces leycettanus* JCM12802 的  $\alpha$ -淀粉酶 Amy13A<sup>[26]</sup>, *TcAmy* 的糖基化修饰程度要明显轻很多。*N*-糖基化修饰后可通过影响酶分子的局部构象而改变其柔性, 进而避免热力学降解, 提高其热稳定性<sup>[27-28]</sup>。大量研究表明, 酶蛋白去除糖基化之后, 酶蛋白的稳定性将大幅度降低。例如, 来源于 *Penicillium oxalicum* SX6 的果胶酶在去除 *N*-糖基化修饰后, 较处理之前的蛋白热稳定性降低了 30%<sup>[29]</sup>。因此, 我们推测低程度的 *N*-糖基化修饰导致 *TcAmy* 无法耐受较高温度的原因之一。

不同的低温酶, 其冷适应性策略不尽相同。低温酶需要在低温下发挥较高的催化活性, 就必须克服酶分子在低温环境下结构刚性太强的问题。目前, 人们普遍认为低温酶以失去其稳定性为代价, 在低温环境下增加结构上的柔性, 从而适应低温环境<sup>[30]</sup>。与中温或高温酶相比, 低温酶通常会具有一个或多个特性, 包括氢键数目降低、盐键数目降低、脯氨酸或者精氨酸的数目降低、甘氨酸数目增多、无规则结构(loop 区)增多和疏水

表面积增多等。为了从结构层面上探讨 *TcAmy* 冷适应性的机制, 我们选择已报道晶体结构的 *Malbranchea cinnamomea*  $\alpha$ -淀粉酶 *McAmyA* (PDB: 3VM7) 来进行对比研究。*McAmyA* 与 *TcAmy* 的氨基酸序列一致性为 55%, 最适温度为 65 °C。如表 3 所示, 低温酶 *TcAmy* 较中温酶 *McAmyA* 而言, Arg 和 Pro 数目比例明显降低, 分别从 3.40% 和 5.32% 减少到 2.74% 和 4.01% ;Gly 的数目比例明显增多, 从 7.87% 增加到 9.28%。这与目前人们对低温酶冷适应性的认识是相一致的。在蛋白质中, Gly 与 Pro 的比率越高, 说明其柔性越强。此外, Arg 带有很长的侧链, 能同时形成 5 个氢键和 2 个盐键, 在中温酶或者高温酶中能够很高地稳定其结构<sup>[31]</sup>。因此, 从氨基酸组成上来看, Gly/Pro 的高比率是  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 冷适应性的原因之二。

在嗜热酶中, 通常会有更多的氨基酸数目参与形成二级结构, 蛋白质内部更多的共价或非共价作用力也会增强其刚性结构, 从而维持其稳定性<sup>[32]</sup>。二硫键是蛋白质分子侧链间唯一的共价键, 对蛋白质的结构稳定性及功能具有重要的作用, 在蛋白质热稳定性分子改良中是一种极其有效的策略。闵柔等将糖苷水解酶第 11 家族耐热木聚糖酶 *EvXyn11<sup>TS</sup>* 的 N 端二硫键破坏之后, 热稳定性大幅度降低<sup>[33]</sup>。低温酶 *TcAmy* 比中温酶

*McAmyA* 的二硫键数目少一对,这也可能是导致其冷适应性的另外原因。除了离子键数目外,低温酶 *TcAmy* 和中温酶 *McAmyA* 中的非共价键数目非常接近(表 3)。离子键的形成不仅是静电相互吸引,也是熵增加的过程。中温酶 *McAmyA* 中的离子键数目为 46 对,要明显多于低温酶 *TcAmy* (34 对)。当温度升高时,离子键的稳定性增加,使得 *McAmyA* 保持稳定<sup>[34]</sup>。嗜热酶通常会降低其溶剂可及表面积(solvent accessible surface area, SASA)来巩固蛋白内部的作用网络密度<sup>[35]</sup>。然而,低温酶 *TcAmy* 的 SASA 比中温酶 *McAmyA* 要低 265.2 Å<sup>2</sup>,而且蛋白表面暴露的极性 SASA 比中温酶 *McAmyA* 还要高 668.9 Å<sup>2</sup>。这就说明溶

剂可及表面积并不是低温酶冷适应性的关键因素。张勇等对 *Caldicellulosiruptor bescii* 来源的嗜热木聚糖酶嗜热机制研究也得到了相同结论<sup>[36]</sup>。从分子内部相互作用力方面来看,二硫键数目和离子键数目降低是  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 冷适应性的原因之三。

综上,本研究获得了一个新的低温  $\alpha$ -淀粉酶基因,并在毕赤酵母中成功实现了高效异源表达。低温  $\alpha$ -淀粉酶 *TcAmy* 性质优良,有很好的应用前景。通过 *N*-糖基化、氨基酸组成和分子内部相互作用力 3 个方面分析了其冷适应性的分子机制,加深了低温  $\alpha$ -淀粉酶在结构与功能相互关系的认识。

表 3. 低温酶 *TcAmy* 和中温酶 *McAmyA* 序列和结构参数比较

Table 3. Comparison of the sequence and structural factors between *TcAmy* and *McAmyA*.

Statistics	<i>TcAmy</i> (474 amino acids in total)	<i>McAmyA</i> (470 amino acids in total)
Number of residues		
Arg	13 (2.74%)	16 (3.40%)
Gly	44 (9.28%)	37 (7.87%)
Pro	19 (4.01%)	25 (5.32%)
Gly/Proratio	2.32	1.48
Non-covalent interactions		
No. of disulfide bridges	3	4
No. of hydrophobic interactions (5Å)	421	420
No. of hydrogen bonds	924	996
No. of salt bridges (6Å)	34	46
No. of aromatic-aromatic interactions	34	33
No. of cation- $\pi$ interactions	15	17
Molecular surface		
Accessible surface area (SASA, Å <sup>2</sup> )	16253.6	16518.8
Exposed nonpolar SASA (Å <sup>2</sup> )	8993.7	9037.7
Exposed polar SASA (Å <sup>2</sup> )	4642.5	3973.6
Exposed charged SASA (Å <sup>2</sup> )	2617.4	3507.5

## 参考文献

- [1] Shannon JC, Garwood DL, Boyer CD. Genetics and physiology of starch development//Bemiller JN, Whistler B, eds. Starch: Chemistry and Technology. 3rd Ed. New York: Academic Press, 2009: 23–82.
- [2] van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 2002, 94(2): 137–155.
- [3] Sindhu R, Binod P, Madhavan A, Beevi US, Mathew AK, Abraham A, Pandey A, Kumar V. Molecular improvements in microbial  $\alpha$ -amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1740–1748.
- [4] Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 345–351.
- [5] Luo ZG, Yang JF, Luo FX. Properties and applications of  $\alpha$ -amylase. *Food Research and Development*, 2007, 28(8): 163–167. (in Chinese)  
罗志刚, 杨景峰, 罗发兴.  $\alpha$ -淀粉酶的性质及应用. *食品研究与开发*, 2007, 28(8): 163–167.
- [6] Asgher M, Asad MJ, Rahman SU, Legge RL. A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 2007, 79(3): 950–955.
- [7] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal*, 1991, 280(2): 309–316.
- [8] Kuriki T, Imanaka T. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(5): 557–565.
- [9] Sun HY, Zhao PJ, Ge XY, Xia YJ, Hao ZK, Liu JW, Peng M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 160(4): 988–1003.
- [10] Yang G, Yao H, Mozzicafreddo M, Ballarini P, Pucciarelli S, Miceli C. Rational engineering of a cold-adapted  $\alpha$ -amylase from the antarctic ciliate *Euplotes focardii* for simultaneous improvement of thermostability and catalytic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(13): e00449–17.
- [11] Feller G, Payan F, Theys F, Qian M, Haser R, Gerday C. Stability and structural analysis of  $\alpha$ -amylase from the antarctic psychrophile *Alteromonas haloplanctis* A23. *The FEBS Journal*, 1994, 222(2): 441–447.
- [12] Prajapati VS, Trivedi UB, Patel KC. A statistical approach for the production of thermostable and alklophilic alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* KCP2 under solid-state fermentation. *Biotech*, 2015, 5(2): 211–220.
- [13] Vujičić-Žagar A, Dijkstra BW. Monoclinic crystal form of *Aspergillus niger*  $\alpha$ -amylase in complex with maltose at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 2006, 62(8): 716–721.
- [14] Cavallo L, Kleinjung J, Fraternali F. POPS: A fast algorithm for solvent accessible surface areas at atomic and residue level. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3364–3366.
- [15] Lu ZH, Wang QH, Jiang SJ, Zhang GM, Ma YH. Truncation of the unique N-terminal domain improved the thermostability and specific activity of alkaline  $\alpha$ -amylase Amy703. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22465.
- [16] Han P, Zhou P, Hu SQ, Yang SQ, Yan QJ, Jiang ZQ. A novel multifunctional  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*: biochemical characterization and three-dimensional structure. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(2): 420–435.
- [17] Yin YC, Mao YZ, Yin XL, Gao B, Wei DZ. Construction of a shuttle vector for heterologous expression of a novel fungal  $\alpha$ -amylase gene in *Aspergillus oryzae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 25(7): 988–998.
- [18] Matsubara T, Ben Ammar Y, Anindyawati T, Yamamoto S, Ito K, Iizuka M, Minamiura N. Degradation of raw starch granules by  $\alpha$ -amylase purified from culture of *Aspergillus awamori* KT-11. *Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 37(4): 422–428.
- [19] Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31(2): 135–152.
- [20] Dheeran P, Kumar S, Jaiswal YK, Adhikari DK. Characterization of hyperthermostable  $\alpha$ -amylase from *Geobacillus* sp. IPTN. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1857–1866.
- [21] Michelin M, Silva TM, Benassi VM, Peixoto-Nogueira SC, Moraes LA, Leão JM, Jorge JA, Terenzi HF, de Lourdes TM, Polizeli M. Purification and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*.

- Carbohydrate Research*, 2010, 345(16): 2348–2353.
- [22] Yi ZL, Fang Y, He KZ, Liu DY, Luo HB, Zhao D, He H, Jin YL, Zhao H. Directly mining a fungal thermostable  $\alpha$ -amylase from Chinese Nong-flavor liquor starter. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17: 30.
- [23] Li S, Zuo ZR, Niu DD, Singh S, Permaul K, Prior BA, Shi GY, Wang ZX. Gene cloning, heterologous expression, and characterization of a high maltose-producing  $\alpha$ -amylase of *Rhizopus oryzae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164(5): 581–592.
- [24] Öberg F, Sjöhamn J, Fischer G, Moberg A, Pedersen A, Neutze R, Hedfalk K. Glycosylation increases the thermostability of human aquaporin 10 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(36): 31915–31923.
- [25] Fonseca-Maldonado R, Vieira DS, Alpointi JS, Bonheil E, Thibault P, Ward RJ. Engineering the pattern of protein glycosylation modulates the thermostability of a GH11 xylanase. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(35): 25522–25534.
- [26] Zhang DD, Tu T, Wang Y, Li YQ, Luo XG, Zheng F, Wang XY, Bai YG, Huang HQ, Su XY, Yao B, Zhang TC, Luo HY. Improving the catalytic performance of a *Talaromyces leycettanus*  $\alpha$ -amylase by changing the linker length. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(24): 5041–5048.
- [27] Shental-Bechor D, Levy Y. Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(24): 8256–8261.
- [28] Anbarasan S, Jänis J, Paloheimo M, Laitaoja M, Vuolanto M, Karimäki J, Vainiotalo P, Leisola M, Turunen O. Effect of glycosylation and additional domains on the thermostability of a family 10 xylanase produced by *Thermopolyspora flexuosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(1): 356–360.
- [29] Tu T, Bai YG, Luo HY, Ma R, Wang Y, Shi PJ, Yang PL, Meng K, Yao B. A novel bifunctional pectinase from *Penicillium oxalicum* SX6 with separate pectin methylesterase and polygalacturonase catalytic domains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(11): 5019–5028.
- [30] Siddiqui KS, Cavicchioli R. Cold-adapted enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 2006, 75(1): 403–433.
- [31] Leiros I, Moe E, Lanes O, Smalås AO, Willassen NP. The structure of uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*) reveals cold-adaptation features. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 2003, 59(8): 1357–1365.
- [32] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1–43.
- [33] Min R, Li JF, Gao SJ, Zhang HM, Wu J, Wu MC. Correlation between thermostability of the xylanase EvXyn11<sup>TS</sup> and its N-terminal disulfide bridge. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(4): 346–353. (in Chinese)  
闵柔, 李剑芳, 高树娟, 张慧敏, 吴静, 邬敏辰. 木聚糖酶 EvXyn11<sup>TS</sup> 耐热性与其 N 端二硫键的相关性分析. *微生物学报*, 2013, 53(4): 346–353.
- [34] Bhattacharya G, Mitra S, Mandal P, Dutta S, Giri RP, Ghosh SK. Thermodynamics of interaction of ionic liquids with lipid monolayer. *Biophysical Reviews*, 2018, doi: 10.1007/s12551-017-0390-3.
- [35] Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2000, 13(3): 179–191.
- [36] Zhang Y, An J, Yang GY, Zhang XF, Xie Y, Chen LQ, Feng Y. Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic adaptation and substrate binding preference. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2016, 48(10): 948–957.

# Characterization and cold-adaptation mechanism of a cold-active $\alpha$ -amylase from *Thermoascus crustaceus* JCM12803

Xiongzen Yang<sup>1,2</sup>, Yujie Guo<sup>2</sup>, Tao Tu<sup>2\*</sup>, Bin Yao<sup>2</sup>, Huiying Luo<sup>2</sup>, Lihong Miao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei Province, China

<sup>2</sup> Institute of Feed Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** [Objective] To mine the genetic resource of novel cold-active  $\alpha$ -amylases and reveal their cold-adaptation mechanism are of importance to deepen our understanding of cold-active enzyme and provide key information for the molecular improvement of  $\alpha$ -amylase. [Methods] Based on the genome sequence of *Thermoascus crustaceus* JCM12803, we cloned an  $\alpha$ -amylase-encoding gene (*TcAmy*), and inserted it into the expression vector pPIC9. The gene product was heterologously expressed in *Pichia pastoris* GS115 and characterized. By using amino acid sequence analysis and homologous modeling, we studied the cold-adaptation mechanism of *TcAmy* in viewpoint of sequence-structure-function relationship. [Results] *TcAmy* is a typical cold-active  $\alpha$ -amylase, showing optimal activity at 35 °C and remaining 27% maximal activity even at 0 °C. Sequence and structure analysis indicated that in comparison to thermostable counterparts, *TcAmy* has low *N*-glycosylation degree, decreased Pro and Arg contents and increased Gly content, and less disulfide bridges and ionic bonds. [Conclusion] We obtained a novel cold-active  $\alpha$ -amylase, with low *N*-glycosylation degree, specific amino acid composition and intermolecular interactions, all contributing to its cold-adapted property.

**Keywords:** cold-active  $\alpha$ -amylase, *Pichia pastoris*, homologous modeling, cold-adaptation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Chicken Industry Technology System of China (CARS-41) and by the Modern Agricultural Talents Support Project

\*Corresponding author. Tel: +86-10-82106065; E-mail: Tao Tu, tutao@caas.cn, Lihong Miao, miaowhpu@126.com

Received: 23 January 2018; Revised: 11 April 2018; Published online: 16 July 2018