

1 株古细菌海藻糖合成酶系在枯草芽孢杆菌中的诱导表达

王珊瑛, 李由然, 顾正华, 张 梁, 丁重阳, 石贵阳*
(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122;
2. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 来源于古细菌嗜酸硫化叶菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) 的麦芽寡糖基海藻糖合成酶 (maltooligosylterhalose synthase, MTSase) 和麦芽寡糖基海藻糖水解脱酶 (maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, MTHase) 联合作用, 可以利用淀粉为底物生成海藻糖。本研究构建了6种枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭表达载体, 将密码子优化后的MTSase和MTHase编码基因在木糖异构酶基因的启动子及其阻遏蛋白介导下实现了在枯草芽孢杆菌中的功能表达, 木糖启动子分别来源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。在以5 g/L甘油为碳源, 24 g/L蛋白胨为氮源时, 菌体培养8 h后加入终质量浓度为6 g/L的木糖, 37 °C诱导16 h后重组MTSase、MTHase产生联合作用, 海藻糖转化率达到33.57%。实现了MTSase、MTHase在枯草芽孢杆菌中的功能表达。

关键词: 穿梭质粒; 嗜酸硫化叶菌; 枯草芽孢杆菌; 诱导表达

Heterologous Expression of Enzymes for Trehalose Synthesis from *Sulfolobus acidocaldarius* in *Bacillus subtilis*

WANG Shanying, LI Youran, GU Zhenghua, ZHANG Liang, DING Zhongyang, SHI Guiyang*
(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Trehalose has great potential applications in both the medical and food industries due to its unique properties. Enzymatic transformation is superior to extraction from yeast cells for the industrial production of trehalose. Starch can be transformed into trehalose via maltooligosylterhalose synthase (MTSase) and maltooligosyltrehalose trehalohydrolase (MTHase) from *Sulfolobus acidocaldarius*. In this experiment, we constructed six recombinant expression plasmids harboring the codon-optimized MTSase and MTHase encoding genes from *Sulfolobus acidocaldarius*, which could be expressed under the control of the xylose operons from *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus licheniformis*. The recombinant plasmids were transformed into *Bacillus subtilis*, respectively. The effects of different culture conditions on the production of trehalose was investigated and the optimal culture conditions were determined as follows: glycerol concentration as the best carbon source, 5 g/L; peptone concentration as the best nitrogen source, 24 g/L; xylose concentration, 6 g/L; incubation duration, 8 h; and induction temperature, 37 °C; induction time, 16 h. Experiments carried out under these conditions gave a conversion rate of trehalose of 33.57%. This study has successfully achieved the functional expression of MTSase and MTHase in *Bacillus subtilis*.

Key words: shuttle vector; *Sulfolobus acidocaldarius*; *Bacillus subtilis*; inducible expression

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621022

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 21-0124-07

引文格式:

王珊瑛, 李由然, 顾正华, 等. 1 株古细菌海藻糖合成酶系在枯草芽孢杆菌中的诱导表达[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 124-130. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621022. <http://www.spkx.net.cn>

WANG Shanying, LI Youran, GU Zhenghua, et al. Heterologous expression of enzymes for trehalose synthesis from *Sulfolobus acidocaldarius* in *Bacillus subtilis*[J]. Food Science, 2016, 37(21): 124-130. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621022. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31401674); 江南大学自主重点项目 (JUSRP51503)

作者简介: 王珊瑛 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物发酵。E-mail: 1227283739@qq.com

*通信作者: 石贵阳 (1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为发酵工程。E-mail: gyshi@jiangnan.edu.cn

海藻糖是一种广泛存在于低等植物、细菌、真菌等中的非还原性二糖。它是麦芽糖的同分异构体,由两分子葡萄糖通过 α -1,1-糖苷键相连而成。海藻糖化学性质稳定,不具还原性,不易被酸水解,具有稳定生物膜和蛋白质结构的突出功能,因而广泛应用于生物制剂、医药、食品、化妆品等领域^[1]。被在食品领域主要作为甜味剂、保鲜剂、抗变性剂、脱水剂被广泛使用^[2]。海藻糖早期主要从干酵母中提取,提取工艺复杂、产率低。工业生产海藻糖主要有合成法、发酵法、酶转化法^[1]。其中酶转化法具有转化率高、转移性强、作用温和、无污染等优点,被认为是最有发展潜力的海藻糖工业生产方法^[3]。酶转化法根据底物(葡萄糖、麦芽糖和淀粉)不同可以分为3大类^[4]。以葡萄糖为底物时,利用葡萄糖磷酸化酶和海藻糖磷酸化酶可将两分子葡萄糖转化为海藻糖。此过程消耗鸟嘌呤核苷二磷酸(guanosine diphosphate, GDP)等高能物质,且不稳定,难以实现工业化生产^[4]。目前工业上生产海藻糖主要以麦芽糖和淀粉为底物。以麦芽糖为底物时,利用海藻糖合成酶将 α -1,4-键转变为 α -1,1-键,使得麦芽糖在分子内转化为海藻糖^[5-6],转化率高达70%~80%,但该方法反应时间过长,反应温度低(一般为20~30℃)^[2]。以淀粉为底物,依靠麦芽寡糖基海藻糖合成酶(maltooligosyltrehalose synthase, MTSase)和麦芽寡糖基海藻糖水解酶(maltooligosyltrehalose trehalohydrolase, MTHase)可将直链淀粉转化为海藻糖。MTSase作用于直链淀粉还原性末端,将 α -1,4糖苷键转化为 α -1,1糖苷键,形成麦芽寡糖基海藻糖;MTHase内切该中间产物中与海藻糖相连的 α -1,4糖苷键^[7],使之分解成海藻糖和减少两个葡萄糖单位的新麦芽寡糖,如此反复交替就可以将直链淀粉或麦芽寡糖转化为海藻糖,以及少量葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖^[8]。在支链淀粉酶的作用下,海藻糖产率可达80%以上,反应温度在50℃以上^[8]。与海藻糖合成酶催化麦芽糖生成海藻糖相比,该方法催化速率快、副产物少(主要是葡萄糖和麦芽糖)、不易染菌、生产过程稳定性高。这种直接以淀粉为底物高效制取海藻糖的技术,为工业化生产海藻糖开辟了新途径。

MTSase和MTHase存在于节杆菌(*Arthrobacter* sp.)^[9]、根瘤菌(*Rhizobium* sp.)^[10]、古细菌嗜热硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)以及古细菌嗜酸硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)^[11]中,其中硫化叶菌来源的MTSase、MTHase最适反应温度为60~80℃,而节杆菌属等来源的MTSase和MTHase最适反应温度为40~50℃^[8-9,11]。较高的转化温度可以降低染菌概率,便于控制,所以本实验选择硫化叶菌来源的基因进行研究。然而,这些菌株发酵困难,产酶量低,难以实现工业生产,阻碍了以淀粉为原料生产海藻糖的广泛应用。芽孢杆菌一向是工

业生产优势菌株,是当前大规模生产蛋白酶、淀粉酶以及多种生物杀虫剂常用宿主菌^[12]。其中枯草芽孢杆菌是当今工业酶生产中应用最广泛的菌种之一。其优点为蛋白合成量高、安全性好且发酵条件简单^[13],是目前生产淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶等工业用酶的理想生产菌株。枯草芽孢杆菌常用的诱导表达系统有3种。第1类是受异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导的启动子, IPTG与阻遏蛋白结合,从而诱导下游基因的表达;第2类是以木糖为诱导物的启动子,该表达系统由xylR编码的阻遏蛋白严格控制,添加0.1%~2%的木糖就能诱导启动子进行表达;第3类是以蔗糖为诱导物的启动子,该启动子具有连续性,不受蔗糖的控制,但缺少蔗糖表达强度会降低100倍^[12,14]。这3类诱导系统当中, IPTG价格昂贵,毒性较强;而蔗糖的启动强度相对较弱,因而都不适宜外源蛋白大规模发酵生产。

本研究拟将嗜酸硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)编码MTSase、MTHase的YI(23806395)、ZI(3473480)基因在不同来源木糖诱导型启动子的介导下表达,并对重组菌发酵产酶的条件进行优化,以期实现这两种基因在枯草芽孢杆菌中功能的高效表达,为该酶制剂在食品工业中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

表1 实验菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒	相关性/用途	来源
pHY300-PLK	表达载体	江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室
YI	带有YI基因的质粒	苏州金唯智公司合成
ZI	带有ZI基因的质粒	苏州金唯智公司合成
pHY-bs	带有 <i>B. subtilis</i> 来源xyl的质粒	本研究构建
pHY-bm	带有 <i>B. megaterium</i> 来源xyl的质粒	本研究构建
pHY-bl	带有 <i>B. licheniformis</i> 来源xyl的质粒	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY)	带空质粒的对照菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bs-YI)	带有YI基因的重组菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bs-ZI)	带有ZI基因的重组菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bm-YI)	带有YI基因的重组菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bm-ZI)	带有ZI基因的重组菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bl-YI)	带有YI基因的重组菌	本研究构建
<i>B. subtilis</i> (pHY-bl-ZI)	带有ZI基因的重组菌	本研究构建

Bacillus subtilis WB600、*Bacillus megaterium* CICIM B1514、*Bacillus licheniformis* 14580、表达宿主菌*Bacillus subtilis* WB600、大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭质粒pHY300-PLK为江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室保藏,实验涉及的菌株和质粒见表1。芽孢杆菌转化用培养基按照文献[13]配制,重组菌生长培养基LB和筛选培养

基LBA（含氨苄青霉素）以及LBT（含四环素）按照文献[8]配制。重组菌发酵培养基TB按文献[8]配制。重组大肠杆菌培养基中添加终质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素，重组芽孢杆菌转化子培养基中添加终质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素。

1.2 试剂

基因克隆实验中所使用的T4 DNA连接酶、DNA聚合酶大连宝生物工程有限公司；限制性内切酶 立陶宛Fermentas公司；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒以及核苷酸片段纯化试剂盒 苏州科晴生物基因技术有限公司；氨苄青霉素和四环素 美国Sigma公司；其他试剂上海国药集团有限公司。

1.3 方法

1.3.1 重组表达质粒的构建

首先提取*B. subtilis* WB600、*B. megaterium* CICIM B1514、*B. licheniformis* 14580基因组DNA，使用*pfu* DNA聚合酶及引物（表2）扩增获得不同来源的木糖启动子序列。反应条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min后进入下一循环：94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s，52 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2 min，30个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物纯化后经*Bgl* II和*Bam* H I双酶切，连接至同样酶切的载体pHY300-PLK上，获得重组质粒pHY-bs、pHY-bm、pHY-bl。将密码子优化后的Y1、Z1片段经*Bam* H I和*Sma* I双酶切后胶回收，克隆至载体上获得重组质粒pHY-bs-Y1、pHY-bs-Z1、pHY-bm-Y1、pHY-bm-Z1、pHY-bl-Y1、pHY-bl-Z1。

表2 引物列表
Table 2 PCR primers

引物对	编号	引物序列 (5'→3')	酶切位点
A	BSxyl-R	GCCGGATCCGTGATTCCCCCTTAAAA	<i>Bam</i> H I
	BSxyl-F	GCCAGATCTTTACATTGTAATCATGT	<i>Bgl</i> II
B	BMxyl-R	CGCGGATCCCTTGTCATTTCCCCCTTT	<i>Bam</i> H I
	BMxyl-F	GCCAGATCTTAACTAATTATAGGGGT	<i>Bgl</i> II
C	BLxyl-R	AATGGATCTCCGATCTCCCCCTTCAC	<i>Bam</i> H I
	BLxyl-F	GCCAGATCTTTAAAATCTCTCGTTCAT	<i>Bgl</i> II

1.3.2 枯草芽孢杆菌的转化与筛选

枯草芽孢杆菌感受态按照文献[13]制备。

重组质粒的转化：取制备好的感受态悬液，加入1~5 μg 的质粒，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养2.5 h，涂布于抗性再生培养基，培养12 h后，提取抗性平板上转化子的质粒并进行酶切验证，筛选出阳性克隆。

1.3.3 重组MTSase和MTHase的诱导表达

将重组菌*B. subtilis* (pHY-bs-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bs-Z1)、*B. subtilis* (pHY-bm-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bm-Z1)、*B. subtilis* (pHY-bl-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bl-Z1)分别接种于装有15 mL SOB培养基的50 mL三角

瓶中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min振荡培养12 h作为种子。各取1 mL *B. subtilis* (pHY-bs-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bs-Z1)种子液，接种于装有30 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中进行混菌发酵。具体条件为：37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min培养10 h，加入终质量浓度为10 g/L的木糖继续培养14 h。收集发酵液，于4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min条件下离心，用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液（0.2 mol/L，pH 5.4）重悬菌体后超声波破碎细胞（功率为400 W，工作时间为5 min，每破碎1 s，停3 s）。细胞破碎液经高速离心（12 000 r/min、15 min）后弃沉淀，上清液即为酶液。以同样条件得到*B. subtilis* (pHY-bm-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bm-Z1)以及*B. subtilis* (pHY-bl-Y1)、*B. subtilis* (pHY-bl-Z1)混菌发酵表达的重组酶。

1.3.4 双酶法海藻糖生成酶活力的检测

用0.2 mol/L pH 5.4的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制5 g/100 mL麦芽糊精溶液，向该溶液中加入1 mL酶液，于60 $^{\circ}\text{C}$ 反应12 h后加入10 μL 糖化酶，在60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续反应12 h，反应结束后煮沸20 min，反应液经微孔滤膜过滤后用高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）法测定海藻糖含量^[15]，经糖化酶作用后反应液只有葡萄糖与海藻糖。检测条件为：层析柱：XBridge Amide氨基柱；流动相：乙腈-水（4:1，V/V）；流速1.0 mL/min；示差检测器。酶活力定义：在60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.4条件下反应，每小时生成1 μmol 海藻糖所需的酶量定义为1个酶活力单位（U）。

1.3.5 重组枯草芽孢杆菌生长曲线的测定

从平板上挑取重组枯草芽孢杆菌单菌落接种于装有15 mL发酵培养基的50 mL三角瓶中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min过夜培养，转接150 μL 于装有30 mL发酵液体培养基的250 mL三角瓶中，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min振荡培养，定点取样测OD_{600 nm}值。以时间为横坐标绘制重组菌的生长曲线。

1.3.6 不同碳源对酶活力的影响

分别考察葡萄糖、甘油、麦芽糊精、可溶性淀粉作为重组菌生长碳源时的产酶情况，碳源质量浓度为5~20 g/L，培养条件及诱导方法同1.3.3节。发酵结束后菌体稀释20倍，OD_{600 nm}至0.5时进行超声破碎并测定酶活力。

1.3.7 不同氮源对酶活力的影响

分别考察蛋白胨、棉籽粉、(NH₄)₂SO₄和NH₄Cl作为重组菌生长氮源时的产酶情况，氮源质量浓度为12~48 g/L，培养条件及诱导方法同1.3.3节。发酵结束后菌体稀释20倍，OD_{600 nm}至0.5时进行超声破碎并测定酶活力。

1.3.8 诱导剂不同添加时间对酶活力的影响

依照1.3.3节中的培养条件，分别在生长0、2、4、6、8、10、12 h后添加诱导剂，继续发酵，总发酵周期为24 h。发酵结束后菌体稀释20倍，OD_{600 nm}至0.5时进行超声破碎并测定酶活力。

1.3.9 诱导剂不同添加量对酶活力的影响

依照1.3.3节的发酵条件，分别添加0、2、4、6、8、10、15、20 g/L木糖诱导重组酶的表达。发酵结束后菌体稀释20倍，OD_{600 nm}至0.5时进行超声破碎并测定酶活力。

2 结果与分析

2.1 基于密码子水平的表达优化

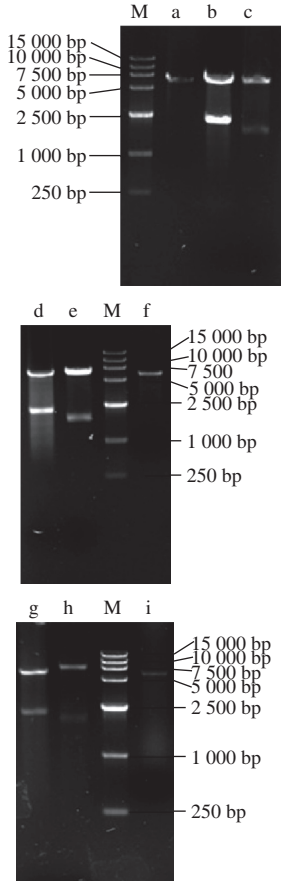
表3 Y1/Z1基因与*B. subtilis*基因密码子使用频率比较
Table 3 Comparison of codon usage between Y1/Z1 genes and *B. subtilis*

密码子	使用频率/%		密码子	使用频率		密码子	使用频率	
	<i>B. subtilis</i>	NCBI中 Y1/Z1基因		<i>B. subtilis</i>	NCBI中 Y1/Z1基因		<i>B. subtilis</i>	NCBI中 Y1/Z1基因
UUU	13.7	49	CCA	5.2	10	AAG	25.8	16
UUC	25.8	22	CCG	18.9	27	<u>AGU</u>	<u>1.7</u>	<u>12</u>
UUA	12	19	CAU	12	10	AGC	10.3	10
UUG	10.3	19	<u>CAC</u>	<u>0</u>	<u>16</u>	AGA	6.9	9
UCC	13.7	10	CAA	17.2	17	<u>AGG</u>	<u>0</u>	<u>2</u>
UCA	8.6	6	CAG	20.6	24	GUU	24.1	17
UUA	13.7	4	CGU	5.2	18	GUC	12	19
<u>UCG</u>	<u>6.9</u>	<u>16</u>	CGC	15.5	24	GUA	20.6	13
UAU	27.5	7	CGA	1.7	16	GUG	12	8
UAC	18.9	27	CGG	5.2	22	GCU	15.5	3
<u>UAA</u>	<u>1.7</u>	<u>29</u>	AUU	27.5	2	GCC	15.5	8
<u>UAG</u>	<u>0</u>	<u>35</u>	AUC	29.2	1	GCA	22.3	5
UGU	3.4	17	<u>AUA</u>	<u>0</u>	<u>20</u>	GCG	27.5	11
<u>UGC</u>	<u>1.7</u>	<u>19</u>	AUG	12	14	GAU	37.8	3
<u>UGA</u>	<u>0</u>	<u>6</u>	ACU	10.3	1	GAC	15.5	26
UGG	5.2	10	ACC	5.2	10	GAA	75.6	22
CUU	25.8	52	ACA	27.5	3	GAG	29.2	15
CUC	12	22	ACG	18.9	5	GGU	17.2	4
<u>CUA</u>	<u>0</u>	<u>29</u>	AAU	17.2	14	GGC	30.9	19
CUG	30.9	22	AAC	17.2	18	GGA	15.5	9
CCU	10.3	23	AAA	60.1	29	GGG	15.5	4
<u>CCC</u>	<u>0</u>	<u>12</u>						

注：下划线.Y1/Z1基因与枯草芽孢杆菌使用频率相差较大的密码子。

通过对Y1、Z1基因序列分析发现，同一样本的这两种基因密码子使用频率相同，偏好性与枯草芽孢杆菌有着明显的差异（表3）。*B. subtilis*稀有密码子有CUA、CCC、AUA、UAG、UGA、AGG及CAC，这些密码子在外源蛋白的枯草芽孢杆菌表达中起着抑制作用。研究表明，稀有密码子的改变可以有效改善蛋白的异源表达^[16]。根据表3中密码子的使用频率，对该基因进行了密码子优化：Y1基因改变了22个碱基，优化后GC含量由48.5%变为48%，密码子适应指数CAI为0.89（CAI为1表示最完美的表达系统），氨基酸未发生变化，分子质量仍为2 160 bp；Z1基因改变了27个碱基，优化后GC含量由50%变为51%，CAI为0.89，氨基酸未发生变化，分子质量仍为1 668 bp。

2.2 重组表达质粒的构建



M.核酸标准分子质量；泳道a. pHY-bs；泳道b. pHY-bs、Y1；泳道c. pHY-bs、Z1；泳道d. pHY-bm、Y1；泳道e. pHY-bm、Z1；泳道f. pHY-bm；泳道g. pHY-bl、Y1；泳道h. pHY-bl、Z1；泳道i. pHY-bl。

图1 MTSase和MTHase重组表达质粒酶切电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of MTSase and MTHase expression plasmids subjected to double enzyme digestion

以*B. subtilis* WB600、*B. megaterium* CICIM B1514、*B. licheniformis* 14580基因组DNA为模板，使用引物对A、B、C（表2）扩增得到的产物大小均为1.4 kb，经测序与NCBI上登记的*B. subtilis*、*B. megaterium*和*B. licheniformis*来源的木糖异构酶启动子连同其调控原件的序列完全一致。首先将它们分别连接至穿梭克隆载体^[17-18] pHY300-PLK，得到重组质粒pHY-bs、pHY-bm、pHY-bl。接下来，将胶回收获得的Y1、Z1酶切片段与以上重组质粒连接，重组质粒经BamH I和Sma I双酶切结果如图1所示。pHY-bs-Y1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和2.1 kb两条条带，pHY-bs-Z1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和1.6 kb两条条带；pHY-bm-Y1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和2.1 kb两条条带，pHY-bm-Z1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和1.6 kb两条条带；pHY-bl-Y1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和2.1 kb两条条带，pHY-bl-Z1经双酶切后进行电泳，出现6.2 kb和

1.6 kb两条条带。双酶切片段大小与目的基因大小一致,表明重组质粒构建成功。

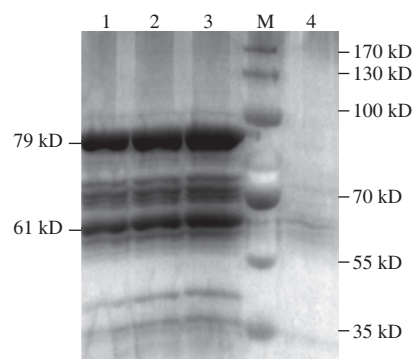
2.3 重组表达质粒在枯草芽孢杆菌WB600中的表达

使用化学转化的方法,将重组质粒转入枯草芽孢杆菌WB600。将阳性转化子接种于发酵培养基中,37℃、200 r/min培养10 h,加入终质量浓度为10 g/L的木糖继续培养14 h。

MTHase和MTSase以淀粉质原料为底物单独作用均无法生成海藻糖。目前文献报道的MTSase酶活力检测方法是以前麦芽寡糖(五糖或六糖)为底物,酶反应结束后利用糖化酶进行消化,HPLC测定糖化液中海藻糖的含量^[8];MTHase酶活力检测方法是以前麦芽寡糖为底物,加入一定酶活力单位的MTSase反应一定时间后,煮沸终止反应,再加入MTHase,反应液用HPLC测定海藻糖的含量^[8]。本研究所构建的重组菌,MTHase和MTSase两个酶编码基因都经过密码子优化,且表达载体和宿主均相同,最大化减少了蛋白表达环节产生的差异。基于以上因素,本研究开发出混菌发酵制备酶液的方式,即以麦芽糊精为底物反应,通过HPLC法测定反应生成的海藻糖以表征两种酶的活力,该方法简单直接。具体操作方式为将携带同一来源启动子的两株重组菌分别活化后,按相同接种量接种至一瓶培养基中进行发酵;发酵结束时稀释20倍的菌体量($OD_{600\text{ nm}}$)为0.5左右,收集菌体后使用超声波破碎制备酶液。所获得的重组酶液经酶活力检测有海藻糖生成。进一步使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析,与野生菌株对比,重组菌在70~100 kD和55~70 kD位置出现了特异蛋白条带(图2),且其分子质量大小分别与预测的79 kD和61 kD一致。以上结果表明 YI 、 ZI 基因在枯草芽孢杆菌WB600中均获得表达。

不同来源的MTHase和MTSase的氨基酸序列不尽一致,蛋白结构的不同造成了功能的差异。*Sulfolobus solfataricus*和*Sulfolobus acidocaldarius*两者MTSase氨基酸序列同源性为51.3%。Kobayashi等^[19]研究表明MTSase转糖苷作用分成两步:先切断麦芽寡糖还原端 α -1,4-糖苷键,再将切断的葡萄糖单体旋转180°后重新连接产生 α -1,1-糖苷键,一旦 α -1,1-糖苷键无法形成,则会产生葡萄糖^[9,19];MTSase这一轻微的水解作用会导致副产物葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖的生成^[8]。与之相比,MTHase水解反应的专一性较强,只能作用于麦芽寡糖基海藻糖中与 α -1,1-糖苷键相连的 α -1,4-糖苷键。不同来源的MTSase、MTHase副产物比例不同,*Arthrobacter* sp.副产物中葡萄糖比例最高^[9],*S. solfataricus*^[8]、*S. acidocaldarius*^[11]副产物中麦芽糖比例最高,均可达10%以上。副产物的比例与底物的选择有关,DE值越高,副

产物比例越高。本研究中重组酶来源*S. acidocaldarius*,产物中麦芽糖比例最高,为10.13%。MTSase和MTHase来源菌株发酵困难,产酶量低,目前大多运用基因工程手段构建重组菌进行发酵生产,已见的报道中宿主菌均为大肠杆菌。大肠杆菌易产生内毒素,不适宜用于食品工业,而我国食品安全标准规定的淀粉水解酶类的安全生产菌株为芽孢杆菌。本研究将 YI 、 ZI 基因导入枯草芽孢杆菌WB600,实现了这两种酶在芽孢杆菌中异源表达。大肠杆菌重组菌产生的重组MTSase、MTHase最适反应温度为60~80℃,最适反应pH值为4.0~6.0,本研究重组酶的最适反应温度为60℃,最适反应pH值为5.4,与大肠杆菌表达重组酶差别不大。



M.蛋白标准分子质量;泳道1. pHY-bl- YI 、pHY-bl- ZI 重组蛋白;泳道2. pHY-bm- YI 、pHY-bm- ZI 重组蛋白;泳道3. pHY-bs- YI 、pHY-bs- ZI 重组蛋白;泳道4.对照菌蛋白。

图2 重组蛋白SDS-PAGE电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE of recombinant proteins

表4 不同来源木糖启动子表达载体海藻糖生成酶活力的比较

Table 4 Comparison of trehalose activity produced by xylose-inducible expression vectors from different sources

启动子来源	$OD_{600\text{ nm}}$	木糖	酶活力/(U/mL)	产量/%
<i>B. subtilis</i>	10.1	+	2.81	23.12
<i>B. megaterium</i>	10.4	+	2.52	20.71
<i>B. licheniformis</i>	11.8	+	2.38	19.52
对照菌	12.9	+	—	—

注: +, 添加木糖; —, 检测不到产物(海藻糖)。

不同来源的诱导启动子启动MTSase和MTHase编码基因转录表达的效率不同。由表4可知,在枯草芽孢杆菌宿主中*B. subtilis*来源的启动子诱导效率最高,*B. megaterium*来源的启动子诱导效率次之,*B. licheniformis*来源的启动子诱导效率最低。

2.4 重组菌菌体生长曲线

微生物发酵通常采用生命力极其旺盛的对数生长期种子液,种子培养时间太短,菌体生长缓慢,致使发酵时间过长;种子培养时间太长,稳定期菌种趋于老化,易发生菌体自溶,且不利于产物的积累。如图3所示,重组菌接种于发酵培养基后经过6 h进入对数生长期,直至

18 h进入稳定期, 21 h后菌体数量维持稳定, 芽孢开始生成。据此, 选择对数生长期的中期12 h作为种龄。

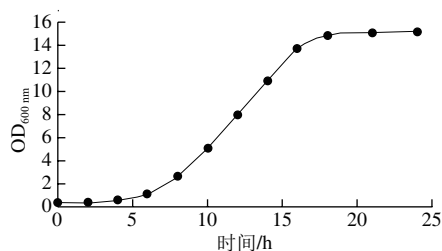


图3 重组菌在发酵培养基中的生长曲线

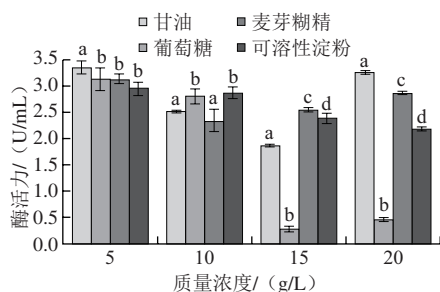
Fig. 3 Growth curve of recombinant strain in fermentation medium

2.5 不同发酵培养基对重组菌产酶的影响

根据表4实验结果, 本研究选择*B. subtilis* (pHY-bl-Y1) 和*B. subtilis* (pHY-bl-Z1) 进行产酶条件优化。以TB培养基为初始培养基, 考察不同碳源和氮源对重组枯草芽孢杆菌生长和产海藻糖的影响。

2.5.1 碳源及其质量浓度对重组菌产酶的影响

分别使用葡萄糖、甘油、麦芽糊精、可溶性淀粉作为重组菌生长的唯一碳源进行发酵, 考察不同碳源对菌体生长和重组MTSase、MTHase酶活力的影响, 重组菌产酶情况如图4所示。结果显示5 g/L的甘油作为碳源能够获得最高的产酶(3.36 U/mL)。葡萄糖、麦芽糊精和可溶性淀粉作为唯一碳源, 重组菌产酶与质量浓度呈负相关趋势。



不同小写字母代表同一质量浓度不同碳源类型差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

图4 不同碳源对重组菌产酶的影响

Fig. 4 Effects of different carbon sources on the production of recombinant enzyme

葡萄糖虽然能够使菌体快速通过延滞期, 促进菌体快速生长, 却并不能获得更多的重组酶; 质量浓度高于15 g/L的葡萄糖更是体现出对产酶的强烈抑制作用。在已报道的有关碳源对芽孢杆菌淀粉水解酶类产酶影响的研究中, 均显示过高的碳源尽管能够促进菌体生长, 但不利于产酶, 这一现象对于葡萄糖这类速效碳源尤为显著^[20]。迟效碳源对于菌体生长的促进效果差, 但有利于产酶水平的提高, 所以麦芽糊精、可溶性淀粉以及甘油能使酶活力维持在较高水平。

2.5.2 氮源及其质量浓度对重组菌产酶的影响

分别使用蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、棉籽粉、 NH_4Cl

作为重组菌发酵的氮源, 考察它们对重组菌产酶的影响, 结果如图5所示。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 不利于菌体生长, 酶活力较低; 重组菌利用蛋白胨产酶量最高。当蛋白胨质量浓度为24 g/L时菌体生长良好, 产酶最高达3.42 U/mL。微生物代谢氮源主要用于合成多种细胞物质, 包括氨基酸、蛋白质、核酸等, 因而会对产酶有重要影响。无机氮源进入细胞后需要与代谢中间产物形成氨基化合物才能被利用, 而有机氮源营养丰富, 除含有丰富的蛋白质、多肽以及游离氨基酸之外, 还含有少量的糖类、脂肪和生长因子等^[21]。因此蛋白胨和棉籽粉比 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 更有利于重组菌的生长和产酶。

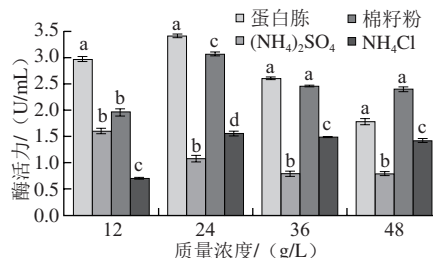


图5 不同氮源对重组菌产酶的影响

Fig. 5 Effects of different nitrogen sources on the production of recombinant enzyme

2.6 诱导剂不同添加时间对重组菌产酶的影响

在确认产酶最佳碳源、氮源种类及其质量浓度和种龄的基础上, 考察诱导剂不同添加时间对重组菌产酶的影响。诱导表达系统的优势在于能够有效地将菌体生长与产酶阶段人为地分开, 有针对性地为菌体生长和产酶提供最佳环境^[22]。诱导剂添加之前外源基因的表达处于休止状态, 不会因其表达给菌体的生长带来负担, 有助于菌体生物量的迅速积累; 而在产酶阶段可根据重组酶的特性调节温度、pH值等环境因素, 使蛋白合成的效率最大化。在枯草芽孢杆菌中, 木糖被吸收进入细胞后可参与细胞物质的合成和能量代谢, 但其利用受到木糖操纵子和分解代谢产物阻遏的双重调控^[22]。因此, 在重组菌特定的生长状态下添加木糖启动外源基因的表达, 会给菌体的生长和产酶带来一定的影响。由表5可知, 8 h之前添加诱导剂, 酶活力和底物转化率逐渐升高, 8 h之后添加诱导剂酶活力和底物转化率逐渐降低。

表5 不同诱导剂添加时间对菌体生长和产酶的影响

Table 5 Effects of different inducer addition times on the growth and enzyme production of recombinant *Bacillus subtilis*

添加时间/h	OD _{600 nm}	酶活力/(U/mL)	转化率/%
0	11.8	1.98	16.23
2	10.8	2.98	24.52
4	10.0	3.27	26.87
6	16.3	3.47	28.48
8	13.8	3.78	30.08
10	15.0	3.50	28.76
12	15.8	2.83	23.22

2.7 诱导剂不同质量浓度对重组菌产酶的影响

在确定诱导剂最佳添加时间后,考察不同质量浓度木糖对重组菌生长和产酶的影响。结果如表6所示,在不添加诱导剂的条件下重组酶完全不表达,这体现出该表达系统在枯草芽孢杆菌宿主中具有极高的严谨性^[22-23]。

表6 不同诱导剂质量浓度对重组菌产酶的影响

Table 6 Effects of different inducer concentrations on the growth and enzyme production of recombinant *Bacillus subtilis*

诱导剂终质量浓度/(g/L)	OD _{600nm}	酶活力/(U/mL)	转化率/%
0	14.0	0.00	0.00
2	10.7	2.69	22.13
4	13.3	3.14	25.81
6	14.8	4.09	33.57
8	12.8	3.57	29.30
10	13.7	3.46	28.43
15	15.0	3.44	28.24
20	13.4	3.21	26.40

由于作为诱导剂的木糖也能被重组菌缓慢利用^[22],因此在一定范围内随着诱导剂质量浓度的提高,重组酶的产量提高,木糖终质量浓度为6 g/L时重组酶酶活力达到最大值4.09 U/mL,进一步提升诱导剂质量浓度重组酶酶活力开始下降。

3 结 论

目前工业上主要采用酶转化法生产海藻糖,其中应用最广泛的是以麦芽糖为底物的单酶法以及以淀粉为底物的双酶法。双酶法以淀粉为原料,在支链淀粉酶的协同作用下以极高得率生产海藻糖,产率可达80%以上。海藻糖合成酶系野生菌株发酵困难,产率极低,因而基因工程手段中重组工程菌生产海藻糖得到越来越广泛的应用。本研究构建了3组不同来源木糖启动子介导的海藻糖合成酶系重组质粒,并对其中酶活力最高的一组进行了发酵条件的优化,5 g/L的甘油和24 g/L的蛋白胨为产酶最适碳源和氮源;诱导剂最佳添加时间为8 h,最佳添加质量浓度为6 g/L,优化后酶活力最高可达4.09 U/mL。利用重组枯草芽孢杆菌表达的MTSase和MTHase,以麦芽糊精为底物,在不添加支链淀粉酶的情况下,60 ℃反应12 h,海藻糖的转化率可达33.57%。很多文献均报道支链淀粉酶的添加能有效提高海藻糖的转化率,陈晓斌等^[8]利用普鲁兰酶,将海藻糖的转化率从35.2%提高至78.7%;Mukai等^[11]从野生*S. acidocaldarius*中纯化得到MTSase和MTHase,在异淀粉酶的协同作用下海藻糖转化率达到82.7%,因此后续工作将从添加支链淀粉酶等方面优化海藻糖生产工艺。

参考文献:

[1] 胡宗利,夏玉先,陈国平,等.海藻糖的生产制备及其应用场景[J].中国生物工程杂志,2004,24(4):44-48. DOI:10.3969/j.issn.1671-8135.2004.04.010.

[2] RICHARDS A, KRAKOWKA S, DEXTER L, et al. Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40(7): 871-898. DOI:dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00011-X.

[3] SCHIRAL C, di DILERNIA I, ROSE M. Trehalose production: exploiting novel approaches[J]. Trends in Biotechnology 2002, 20(10): 420-425. DOI:10.1016/S0167-7799(02)02041-3.

[4] 薛鸿毅,张莉,徐汝意,等.酶法生产海藻糖研究进展[J].中国食品添加剂,2011,21(4):159-162. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2011.04.025.

[5] 戴秀玉,吴大鹏,周坚.大肠杆菌海藻糖合成酶基因的克隆和表达[J].遗传学报,2000,27(2):158-164.

[6] 周春丽,苏虎,李玉萍.海藻糖合成酶基因(TPS)的研究进展[J].食品科技,2006,31(7):28-31. DOI:10.3969/j.issn.1005-9989.2006.07.008.

[7] 苟兴华,王卫,刘达玉,等.麦芽寡糖基海藻糖水解酶基因在巴斯德酵母中的表达及遗传稳定性[J].应用与环境生物学报,2010,16(3):408-411.

[8] 陈晓斌,林建平,金志华,等.硫矿硫化叶菌MTSase和MTHase基因的克隆与表达[J].微生物学通报,2006,33(5):54-58. DOI:10.3969/j.issn.0253-2654.2006.05.012.

[9] ASTHANA R, NIGAM K, MAURYA S, et al. Trehalose-producing enzymes MTSase and MTHase in *Anabaena* 7120 under NaCl stress[J]. Current Microbiology, 2008, 56(5): 429-435. DOI:10.1007/s00284-008-9121-0.

[10] MARUTA K, HATTORI K, NAKADA T, et al. Cloning and sequencing of trehalose biosynthesis genes from *Rhizobium* sp. M-II[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(4): 717-720. DOI:10.1271/bbb.60.717.

[11] MUKAI K, TABUCHI A, NAKADA T, et al. Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. Starch-Stärke, 1997, 49(1): 26-30. DOI:10.1002/star.19970490107.

[12] 沈卫锋,牛宝龙,翁宏飏,等.枯草芽孢杆菌作为外源基因表达系统的研究进展[J].浙江农业学报,2005,17(4):234-238. DOI:10.3969/j.issn.1004-1524.2005.04.015.

[13] 李瑞芳,薛雯雯,黄亮,等.枯草芽孢杆菌感受态细胞的制备及质粒转化方法研究[J].生物技术通报,2011,27(5):227-230.

[14] 赵伟,段莹莹,张曰辉,等.HPLC法检测海藻糖的研究[J].中国酿造,2014,33(10):148-150.

[15] BURGESS-BROWN N A, SHARMA S, SOBOTT F, et al. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 59(1): 94-102. DOI:10.1016/j.pep.2008.01.008.

[16] TROESCHEL S, THIES S, LINK O, et al. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 161(2): 71-79. DOI:10.1016/j.jbiotec.2012.02.020.

[17] ISHIWA H, SHIBAHARA H. New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. II. Plasmid pHY300PLK, a multipurpose cloning vector with a polylinker, derived from pHY460[J]. Genes and Genetic Systems, 1985, 60(3): 235-243. DOI:org/10.1266/jgg.60.235.

[18] KOBAYASHI M, KUBOTA M, MATSUURA Y. Refined structure and functional implications of trehalose synthase from *Sulfolobus acidocaldarius*[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2003, 50(1): 1-8. DOI:10.5458/jag.50.1.

[19] MEYER H, WEIDMANN H, MADER U, et al. A time resolved metabolomics study: the influence of different carbon sources during growth and starvation of *Bacillus subtilis*[J]. Molecular BioSystems, 2014, 10(7): 1812-1823. DOI:10.1039/C4MB00112E.

[20] 龚劲松,李恒,刘恒霞,等.碳氮源对枯草芽孢杆菌发酵产 β -甘露聚糖酶的影响[J].食品与发酵工业,2015,41(10):34-39. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.201510007.

[21] KIM L, MOGK A, SCHUMANN W. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application[J]. Gene, 1996, 181(1): 71-76. DOI:10.1016/S0378-1119(96)00466-0.

[22] ROSENFELD S A, STEVIS P E, HO N W. Cloning and characterization of the xyl genes from *Escherichia coli*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1984, 194(3): 410-415. DOI:10.1007/BF00425552.

[23] 余小霞,田健,刘晓青,等.枯草芽孢杆菌表达系统及其启动子研究进展[J].生物技术通报,2015,31(2):35-44. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.02.005.