

N-糖基化修饰对极端嗜热酸性 α -淀粉酶ApkA酶学性质的影响

曾 静, 郭建军, 袁 林*

(江西省科学院微生物研究所, 江西 南昌 330096)

摘 要: 为探索N-糖基化修饰对极端嗜热酸性 α -淀粉酶ApkA酶学性质的影响, 同时为构建酵母工程菌奠定基础, 将ApkA缺失信号肽突变体ApkAds及含有2个潜在N-糖基化修饰位点的突变体ApkAdsD182N/G373S在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115中进行表达。ApkAds和ApkAdsD182N/G373S在*Pichia pastoris* GS115中大量表达并分泌到胞外, ApkAds的表观分子质量约为45 kD, ApkAdsD182N/G373S的表观分子质量约为55 kD。酶学性质分析表明, 与ApkAds相比, ApkAdsD182N/G373S的酶学性质发生了一定的变化。其最适反应pH值由6.5降低至5.5~6.0, 酸性条件下稳定性增强; 最适反应温度由90℃提高至100℃; 于90℃的半衰期由5 h增加至5.5 h, 于100℃保温10 min后的相对酶活力由32.03%增加至49.04%。结果表明N-糖基化修饰可适当提高ApkA的酸性条件下酶活力和稳定性、最适反应温度、热稳定性。突变体ApkAdsD182N/G373S的酶学性质使其适于淀粉液化工艺的应用。

关键词: 极端嗜热酸性 α -淀粉酶; 毕赤酵母GS115; N-糖基化修饰; 分泌表达

Effect of N-Glycosylation on Enzymatic Characteristics of Hyperthermoacidophilic α -Amylase ApkA

ZENG Jing, GUO Jianjun, YUAN Lin*

(Institute of Microbiology, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330096, China)

Abstract: This study aimed to explore the effect of N-glycosylation on enzymatic characteristics of hyperthermoacidophilic α -amylase ApkA for the purpose of establishing the basis of the development of genetically engineered yeast. Based on the amino acid sequence analysis of ApkA, a signal peptide deleted mutant ApkAds and a double site mutant ApkAdsD182N/G373S containing two potential N-glycosylation sites were constructed and expressed in *Pichia pastoris* GS115. The recombinant α -amylases ApkAds and ApkAdsD182N/G373S were expressed at high levels and secreted into the culture medium. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that the molecular weights of ApkAds and ApkAdsD182N/G373S were about 45 and 55 kD, respectively. Compared with ApkAds, the mutant ApkAdsD182N/G373S showed optimal pH of 5.5–6.0 instead of 6.5. The mutant ApkAdsD182N/G373S was more stable under acidic conditions. Its optimal temperature was 100℃ compared with 90℃ for ApkAds. When incubated at 90℃, ApkAds and ApkAdsD182N/G373S exhibited half-lives of 5 and 5.5 h, respectively. After incubated at 100℃ for 10 min, the residual activities of ApkAds and ApkAdsD182N/G373S were 32.03% and 49.04%, respectively. These results suggest that N-glycosylation moderately increases enzymatic activity and stability under acidic conditions, optimal temperature, and thermostability of ApkA, and the mutant ApkAdsD182N/G373S is ideal for starch liquefaction.

Key words: hyperthermoacidophilic α -amylase; *Pichia pastoris* GS115; N-glycosylation; secretion expression

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706008

中图分类号: Q814

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 06-0048-07

引文格式:

曾静, 郭建军, 袁林. N-糖基化修饰对极端嗜热酸性 α -淀粉酶ApkA酶学性质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 48-54. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706008. <http://www.spkx.net.cn>

ZENG Jing, GUO Jianjun, YUAN Lin. Effect of N-glycosylation on enzymatic characteristics of hyperthermoacidophilic α -amylase ApkA[J]. Food Science, 2017, 38(6): 48-54. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201706008. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2016-05-11

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31501422); 江西省青年科学基金项目(20151BAB214001);

江西省科学院资助项目(2014-YYB-08; 2014-XTPH1-08)

作者简介: 曾静(1986—), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为极端嗜热酶的开发与应用。E-mail: zengjingwhu@126.com

*通信作者: 袁林(1980—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为工业微生物的应用。E-mail: yuanlincn2003@aliyun.com

α -淀粉酶是一类作用于淀粉分子,从其分子内部随机切断 α -1,4糖苷键,生成葡萄糖、还原糖、极限糊精和含4个以上葡萄糖残基的低聚糖的水解酶^[1-3]。 α -淀粉酶是最重要的工业酶制剂之一,占全球工业用酶份额的30%,在食品、医药以及制糖工业等多种领域都有应用^[4-6]。耐高温 α -淀粉酶常被应用于淀粉液化工艺,将淀粉水解成低分子质量的糊精,以制造各种糖浆^[7-8]。

目前淀粉液化工艺存在以下几个主要缺点:105℃条件下 α -淀粉酶易失活、温度和pH值的反复调节、 Ca^{2+} 的添加和排除等^[9-10]。已报道的文献表明极端嗜热微生物来源的极端嗜热酸性 α -淀粉酶具有较好的高温活性和热稳定性^[11-12]。因此,极端嗜热酸性 α -淀粉酶在淀粉液化工艺中的应用,可以简化淀粉液化工艺流程、避免pH值的反复调节,同时可以降低能耗、提高转化率、减少环境污染,使产品的质量和产量大大提高^[8]。但是极端嗜热微生物的培养条件严格,并且产酶量低,直接从极端嗜热微生物中分离获得极端嗜热酸性 α -淀粉酶的产率较低,从而不易大量获得极端嗜热酸性 α -淀粉酶,使其应用受到限制^[13-14]。因此将极端嗜热酸性 α -淀粉酶的基因进行克隆并在常温表达宿主中进行表达,以获得适用于淀粉液化工艺的 α -淀粉酶具有重要的应用意义。

由极端嗜热古生菌*Thermococcus kodakarensis* KOD1所产生的胞外 α -淀粉酶ApkA具有较好的高温活性和热稳定性^[15],其最适反应温度为90℃,100℃条件下可保持80%的酶活力,110℃条件下仍有20%的酶活力。ApkA的最适反应pH值为6.5,于pH 4.5保持40%的酶活力。该酶在未补加 Ca^{2+} 的条件下于90℃保温1h后保持90%的剩余活力。鉴于ApkA具有较好的高温活性和热稳定性,并且耐酸性强,因此其在淀粉液化工艺中具有较大的应用潜力。但是将ApkA应用于淀粉液化工艺仍存在较多的问题,例如ApkA的最适反应温度、最适反应pH值以及耐酸耐热性与工业用酶的要求还有一定的距离^[16];重组 α -淀粉酶ApkA的宿主菌的安全性。为了达到生产的目的,本研究采用分子生物学技术来提高ApkA的最适作用温度、降低最适作用pH值、提高耐酸耐热性,并采用酵母作为表达的宿主菌。本研究将密码子优化改造后的人工合成ApkAds基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115中表达,获得重组 α -淀粉酶ApkAds。另外,本研究通过对比ApkA与极端嗜热酸性 α -淀粉酶PFA的氨基酸序列,设计在ApkA中构建潜在的N-糖基化修饰位点,选定待突变的氨基酸残基,并采用定点突变技术构建突变体,在*Pichia pastoris* GS115中表达,验证突变体的酶学性质,从而为ApkA的开发和应用研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌DH5 α 、大肠杆菌克隆载体pUC57、*Pichia pastoris* GS115、穿梭质粒pPIC9K均由江西省科学院微生物研究所分子生物学实验室保存。

1.1.2 培养基

大肠杆菌的培养和转化采用LB培养基。*Pichia pastoris*的培养、转化、筛选及诱导表达采用酵母浸出粉胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YPD)培养基、MD(minimal dextrose)培养基、BMGY(buffered glycerol-complex)培养基、BMMY(buffered methanol-complex)培养基。

1.1.3 试剂

KOD DNA聚合酶及KOD-Plus-neo DNA聚合酶 日本Toyobo公司;DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA Marker、低分子量蛋白质Marker 美国Fermentase公司;DNA胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒 美国Omega Bio-tek公司;Chelating Sepharose™ Fast Flow 美国GE Healthcare公司;Bradford法蛋白浓度测定试剂盒 上海生工生物工程股份有限公司;其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

基因合成由上海博益生物科技有限公司完成,聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 仪器与设备

PCR仪 德国Eppendorf公司;TY04S-3C凝胶成像系统 北京君意东方电泳设备有限公司;SP-752PC紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司;SCIENTZ-II D超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司;MicroPulser电穿孔仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 分子克隆技术和表达产物的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析

分子克隆技术和表达产物的SDS-PAGE分析参照文献[17-18]进行。

1.3.2 重组质粒pPIC9K-ApkAds的构建及鉴定

α -淀粉酶ApkA基因ApkA由上海博益生物科技有限公司合成,将基因ApkA连接至载体pUC57构建质粒pUC57-ApkA,见表1。设计引物ApkAds-F、ApkAds-R扩增基因ApkA不含信号肽的结构基因ApkAds。以质粒pUC57-ApkA为模板,采用引物ApkAds-F、ApkAds-R,进行PCR扩增。PCR扩增条件为:98℃ 5 min; 98℃ 20 s, 60℃ 20 s, 74℃ 2 min, 30个循环; 74℃ 10 min。扩增

产物经EcoR I和Not I双酶切,连接至载体pPIC9K,构建亚克隆pPIC9K-*ApkAds*。采用EcoR I和Not I双酶切质粒鉴定是否有外源基因的插入。

表1 构建重组质粒所用引物

Table 1 Primer sequences used for the construction of recombinant plasmids

引物名称	序列
<i>ApkAds</i> -F	5'-CAGGAATTCGCGCAAAGTATTCCGAAGCTCGAAG-3'
<i>ApkAds</i> -R	5'-ATAAGAATGCGGCGCGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT-3'
D182N-F	5'-GCTCTGGGCGAGC[<u>AA</u> C]GAGAGCTACGCCGCC-3'
D182N-R	5'-GGCGGCGTAGCTCTC[<u>GT</u> T]GCTCGCCAGAGC-3'
G373S-F	5'-GTACATCAACCTC[<u>AG</u> C]TCTAGCAAGGTC-3'
G373S-R	5'-GACCTTGCTAGA[<u>GCT</u>]GAGGTTGATGTAC-3'

注:下划线标注部分为限制性酶切位点,方框标注部分为突变位点。

1.3.3 重组质粒pPIC9K-*ApkAds*D182N/G373S的构建及鉴定

根据点突变试剂盒的说明,结合 α -淀粉酶ApkA基因*ApkA*和拟突变的氨基酸位点设计引物D182N-F、D182N-R、G373S-F、G373S-R。以pPIC9K-*ApkAds*为模板,采用引物D182N-F和D182N-R,进行PCR扩增得到包含载体序列和基因序列的线性片段。PCR扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 20 s, 68℃ 5 min, 35个循环; 68℃ 10 min。扩增产物经Dpn I酶处理后,转化大肠杆菌DH5 α ,卡那霉素抗性平板筛选转化子,测序鉴定是否为突变基因*ApkAds*D182N。在此基础上,以pPIC9K-*ApkAds*D182N为模板,采用引物共G373S-F和G373S-R,进行PCR扩增,重复以上实验步骤,获得重组质粒pPIC9K-*ApkAds*D182N/G373S。

1.3.4 *Pichia pastoris*转化及高表达重组子的筛选

用限制性内切酶Bgl II酶切重组质粒pPIC9K-*ApkAds*和pPIC9K-*ApkAds*D182N/G373S,使其线性化,回收后于-20℃条件下保存。*Pichia pastoris* GS115感受态细胞的制备参照文献[19]进行。取5 μ L线性化重组质粒(约5~20 μ g),加入到40 μ L感受态细胞中,并将混合物迅速转移到0.2 cm电转杯中。将加有混合物的电转杯冰浴5 min后,采用MicroPulser电穿孔仪电击细胞,参数设置为:1.5 kV, 5 ms。电击完成后,立即向其中加入1 mL冰浴的山梨醇,并将细胞转移至无菌Eppendorf管中,全部涂布MD平板(200 μ L/块),30℃条件下培养2 d。

向转化平板MD上加入适量无菌水,用涂布棒将长出的转化子收集到无菌Eppendorf管中。经适当稀释后,将转化子分别涂布于含有不同质量浓度G418(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/mL)的YPD平板上。于30℃条件下培养2~5 d后,选取抗G418质量浓度最大并且生长最快的菌落,接种于5 mL YPD液体培养基中,30℃条件下培养过夜。采用Easy DNA kit提取酵母基因组DNA,进行PCR鉴定,保存阳性克隆。

1.3.5 重组 α -淀粉酶的诱导表达和纯化

接种单克隆到100 mL BMGY培养基中,30℃条件下振荡培养至菌液OD_{600 nm}为2~6。1 500×g离心5 min收集细胞,用约10~20 mL BMMY培养基重悬细胞,继续于30℃条件下振荡培养。每隔24 h补加甲醇至其最终体积分数为0.5%,诱导细胞表达重组蛋白质。从24 h开始,每隔12 h取样,测定上清液中 α -淀粉酶的酶活力,分析表达情况。

采用Ni²⁺亲和层析柱对发酵上清液中目的蛋白质进行纯化,用250 mmol/L咪唑洗脱缓冲液洗脱,即得到纯化后的重组 α -淀粉酶。利用SDS-PAGE检测重组 α -淀粉酶的纯度,并采用Bradford法测定重组 α -淀粉酶的质量浓度。

1.3.6 α -淀粉酶活力测定

将10 μ L酶液与490 μ L 50 mmol/L pH 6.5 2-(*N*-吗啡啉)乙磺酸(2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid, MES)缓冲液(含1 g/100 mL可溶性淀粉)混合,于90℃条件下反应30 min后,迅速放入冰水浴中终止反应,然后采用3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)法^[20]测定反应体系中还原糖的物质的量。酶活力单位(U)定义:在一定反应条件下,每分钟催化产生1 μ mol还原糖的酶量为一个酶活力单位。

1.3.7 α -淀粉酶的酶学性质研究

按照上述反应体系混合酶液和底物,分别于40~110℃条件下反应30 min,测定不同温度条件下绝对酶活力,并以绝对酶活力对反应温度作图,确定其最适反应温度。

将酶液与不同pH值的1 g/100 mL可溶性淀粉溶液混合,于90℃条件下进行酶活力测定。采用不同缓冲液配制不同pH值的1 g/100 mL可溶性淀粉溶液:50 mmol/L MES(pH 4.0~7.0)、50 mmol/L 3-(*N*-吗啡啉代)丙磺酸缓冲液(3-(*N*-morpholino)-propanesulfonic acid, MOPS)(pH 7.0~9.0)。

将酶液与不同pH值的Britton-Robinson缓冲液(pH 4.0~9.0)混合,分别于90、100℃保温1 h后取出样品,根据如上反应体系测定酶活力。将未处理酶液的酶活力定义为100%,并以相对酶活力的百分比对pH值作图,评价酶的pH值稳定性。

将酶液分别于90、100℃保温,分时间梯度取出部分样品,根据如上反应体系测定酶活力。将未处理的酶液的酶活力定义为100%,并以相对酶活力的百分比对时间作图,评价酶的热稳定性。

1.4 数据统计分析

α -淀粉酶的酶学性质研究实验中,每个实验做3个平行。运用软件SigmaPlot 11.0对试验数据进行统计分析并作图,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 定点突变位点的选择

PFA	SNESYAAYLSIGFDGWRFDYVKGYGAWVVRDVLNWWGGHAYGETWDTNVDALLSWAYES 240
ApkA	SDESIAAYLSIGVDWRFYVKGYGAWVVKDVLNWWGGHAYGETWDTNVDALLNWAYSS 240
	*:*****. *.*****:*****.***.*
	▲
PFA	SKRPGLITYINLSPNVRWVYVVKFAGACIHEYTGNLGGWVDKRVSSGWVYLEAPPHD 420
ApkA	SKRPGLITYINLSSKVRWVYVVKFAGACIHEYTGNLGGWVDKRVSSGWVYLEAPAYD 420
	*:*****.*****:*****.***.*
	▲

PFA.来源于*Pyrococcus furiosus*的 α -淀粉酶 (gi: 499321102); ApkA.来源于*Thermococcus kodakarensis* KOD1的 α -淀粉酶 (gi: 57641819); 下划线.PFA中潜在的N-糖基化修饰位点; ▲. ApkA中待突变的氨基酸残基, 240、420.各 α -淀粉酶的氨基酸编号。*.表示PFA和ApkA中相同的氨基酸残基; .表示PFA和ApkA中侧链极性相同的氨基酸残基; .表示PFA和ApkA中侧链极性不同的氨基酸残基。

图1 ApkA与PFA的氨基酸序列比对结果

Fig. 1 Sequence comparison of ApkA and PFA

采用BLAST分析ApkA的氨基酸序列, 结果表明ApkA与来源于极端嗜热古生菌*Pyrococcus furiosus*的 α -淀粉酶PFA具有最高的氨基酸序列相似性, 其氨基酸序列相似性高达89%。PFA是目前已知热稳定性最好的 α -淀粉酶之一^[21], 具有优良的高温活性和热稳定性, 其最适反应温度高达100℃, 于98℃的 α -淀粉酶活力高达3 900 U/mg, 在未补加Ca²⁺的条件下于98℃的半衰期长达13 h, 最适反应pH值为5.5~6.0。郭建强等^[22]将PFA于*Pichia pastoris* GS115中进行异源表达, 重组PFA在酵母细胞中大量表达并分泌到胞外。与大肠杆菌中表达得到的重组PFA相比, 酵母细胞中表达得到的重组PFA的高温活性和热稳定性基本不变, 但是其分子质量偏大(约为60 kD), 最适反应pH值偏低(约为4.5~5.0), 这些可能与其糖基化修饰相关。采用N连接糖基化在线预测软件NetNGlyc1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对PFA的氨基酸序列进行分析, 发现PFA中存在两个潜在的N-糖基化修饰位点, 如图1所示。本研究设计ApkA中氨基酸残基D182和G373为突变位点, 构建点突变体ApkAdsD182N/G373S, 并分别将野生型ApkAds和突变体ApkAdsD182N/G373S于*Pichia pastoris* GS115中进行表达, 探讨N-糖基化修饰对ApkA性质的影响。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

根据*Pichia pastoris*的密码子偏好性^[23], 经密码子优化设计, 采用化学合成法合成了极端嗜热 α -淀粉酶ApkA的基因ApkA, 将基因ApkA连接至载体pUC57构建质粒pUC57-ApkA。以质粒pUC57-ApkA为模板, 采用PCR方法扩增目标片段ApkAds, 并连接至载体pPIC9K, 构建质粒pPIC9K-ApkAds。在质粒pPIC9K-ApkAds的基础上, 采用定点突变技术构建质粒pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S。采用限制性内切酶EcoR I和Not I酶切质粒pPIC9K-ApkAds

和pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S, 得到大小分别约为9 kb和1.3 kb的2个片段(图2)。

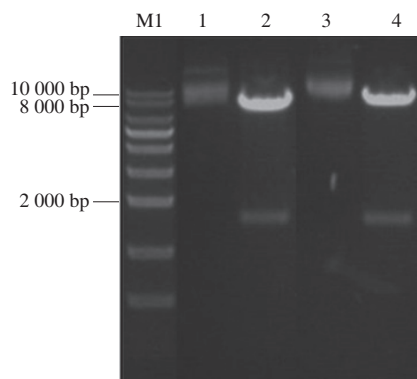


图2 重组质粒的酶切鉴定
M1. 1 kb DNA ladder; 1.质粒pPIC9K-ApkAds; 2.质粒pPIC9K-ApkAds经EcoR I和Not I双酶切的产物; 3.质粒pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S; 4.质粒pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S经EcoR I和Not I双酶切的产物。

图2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant vectors by restriction enzyme digestion

2.3 重组酵母基因组DNA的PCR鉴定

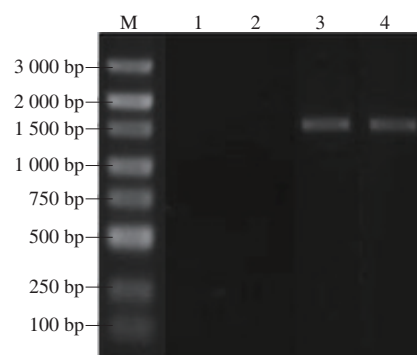


图3 重组酵母基因组DNA的PCR鉴定
M. DL3000 Marker; 1. *Pichia pastoris* GS115; 2. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K; 3. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAds; 4. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S。

图3 重组酵母基因组DNA的PCR鉴定

Fig. 3 PCR identification of recombinant yeast genomic DNA

分别提取宿主菌*Pichia pastoris* GS115、对照转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K、阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAds、阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S的基因组。分别以这4种基因组为模板, 采用引物ApkAds-F、ApkAds-R, 进行PCR鉴定。结果如图3所示, 以宿主菌*Pichia pastoris* GS115的基因组和对照转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K的基因组为模板的反应均无扩增产物出现, 而以阳性转化子(包括*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAds和*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAdsD182N/G373S)的基因组为模板的反应均有约1.3 kb的扩增产物出现。以上结果表明, 阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAds和*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-ApkAdsD182N/

G373S的基因组中已分别整合了 α -淀粉酶的基因 $ApkAds$ 和 $ApkAdsD182N/G373S$ 。

2.4 重组 α -淀粉酶的诱导表达与纯化

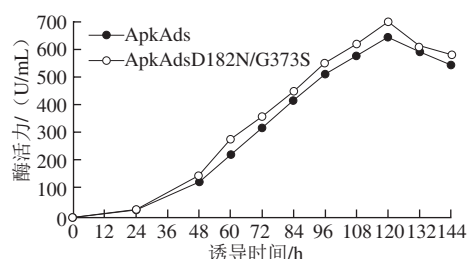
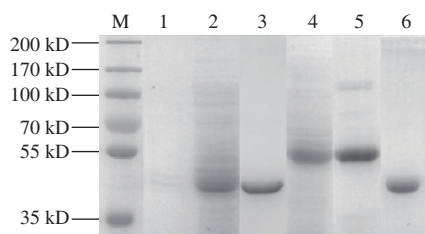


图4 诱导时间对酶活力的影响

Fig. 4 Time-dependent induction of α -amylase activity

将对照转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K、阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAds$ 和*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAdsD182N/G373S$ 诱导培养6 d, 每隔12 h取样并收集上清液, 测定上清液中 α -淀粉酶活力。结果表明(图4), 对于阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAds$ 和*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAdsD182N/G373S$, 在诱导培养的1~5 d内, 上清液中的 α -淀粉酶活力随时间的增加基本上呈线性关系; 在诱导培养5 d后, 上清液中 α -淀粉酶活力达到最大值; 诱导培养5.5 d后, 上清液中 α -淀粉酶活力开始下降。



M. 低分子量蛋白质Marker; 1. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K诱导表达后上清液; 2. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAds$ 诱导表达后上清液; 3. 采用 Ni^{2+} 亲和和层析获得的 $ApkAds$ 纯化样品; 4. *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAdsD182N/G373S$ 诱导表达后上清液; 5. 采用 Ni^{2+} 亲和和层析获得的 $ApkAdsD182N/G373S$ 纯化样品; 6. $ApkAdsD182N/G373S$ 经糖苷酶EndoH_i处理后的产物。

图5 重组 α -淀粉酶的SDS-PAGE检测图

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant α -amylases

同时采用SDS-PAGE分析对照转化子和阳性转化子诱导培养5 d后重组 α -淀粉酶的表达情况, 结果如图5所示。阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAds$ 的上清液中有一条约45 kD大小的蛋白质条带, 即*Pichia pastoris* GS115表达的重组 α -淀粉酶 $ApkAds$ 与大肠杆菌表达的重组 α -淀粉酶 $ApkAds$ 的表观分子质量大小一致; 阳性转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K- $ApkAdsD182N/G373S$ 的上清液中有一条约55 kD大小的蛋白质条带;

而对照转化子*Pichia pastoris* GS115/pPIC9K的上清液中没有这两种大小的蛋白质条带。采用 Ni^{2+} 亲和和层析柱纯化位于上清液中的目的蛋白质, 得到纯化后的重组 α -淀粉酶 $ApkAds$ 和 $ApkAdsD182N/G373S$ 。此外, $ApkAdsD182N/G373S$ 经糖苷酶EndoH_i处理后, 其表观分子质量明显减小, 约为45 kD, 与 $ApkAds$ 的表观分子质量大小基本一致。这表明, *Pichia pastoris* GS115表达的重组 α -淀粉酶 $ApkAds$ 未受到糖基化修饰, 而其突变体 $ApkAdsD182N/G373S$ 受到糖基化修饰, 所以其表观分子质量比 $ApkAds$ 大。

2.5 重组 α -淀粉酶的酶学性质

2.5.1 pH值对重组 α -淀粉酶活力的影响

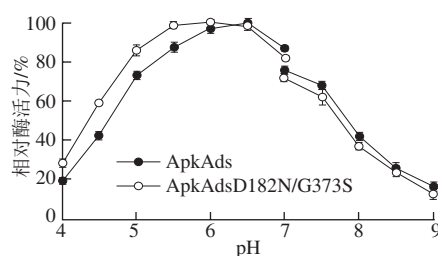


图6 pH值对酶活力的影响

Fig. 6 pH dependence of α -amylase activity

由图6可知, $ApkAds$ 的最适反应pH值约为6.5, 于pH 4.5~8之间可保持40%以上的相对酶活力; $ApkAdsD182N/G373S$ 的最适反应pH值约为5.5~6.0, 于pH 4.5~7.5之间可保持60%以上的相对酶活力。与 $ApkAds$ 相比, 突变体 $ApkAdsD182N/G373S$ 在酸性条件下的相对酶活力得到提高。

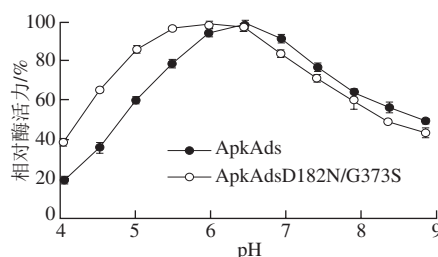


图7 90 °C条件下作用1 h酶的pH值稳定性

Fig. 7 pH stability of α -amylases at 90 °C for 1 h

由图7可知, $ApkAds$ 、 $ApkAdsD182N/G373S$ 分别在90 °C、pH 4.5~9.0和90 °C、pH 4.0~9.0条件下具有较好的稳定性, 相对酶活力均大于40%。

由图8可知, $ApkAds$ 、 $ApkAdsD182N/G373S$ 分别在100 °C、pH 5.0~8.0和100 °C、pH 4.5~8.0具有较好的稳定性, 相对酶活力均大于40%。即与 $ApkAds$ 相比, 突变体 $ApkAdsD182N/G373S$ 在酸性条件下的稳定性得到提高。

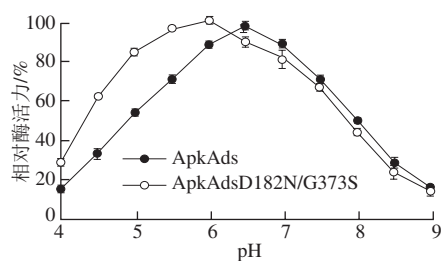


图8 100 °C条件下作用1 h后酶的pH值稳定性
Fig. 8 pH stability of α -amylases at 100 °C for 1 h

2.5.2 温度对重组 α -淀粉酶活力的影响

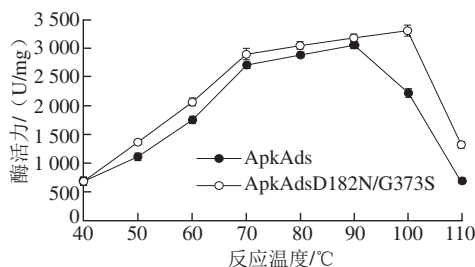


图9 温度对酶活力的影响
Fig. 9 Temperature dependence of α -amylase activity

由图9可知, ApkAds的最适反应温度为90 °C, 在此温度条件下的绝对酶活力为3 056.75 U/mg, 并且在60~100 °C间可保持60%以上的相对酶活力; ApkAdsD182N/G373S的最适反应温度为100 °C, 在此温度下的绝对酶活力为3 301.08 U/mg, 并且在50~110 °C间其绝对酶活力均高于ApkAds的绝对酶活力。与ApkAds相比, 突变体ApkAdsD182N/G373S的最适反应温度和绝对酶活力均得到提高。

2.5.3 重组 α -淀粉酶的热稳定性

由图10、11可知, 在90 °C和100 °C条件下, 突变体ApkAdsD182N/G373S的热稳定性均高于ApkAds的热稳定性。其中ApkAds于90 °C的半衰期约为5 h, ApkAdsD182N/G373S于90 °C的半衰期约为5.5 h。于100 °C保温10 min后, ApkAds保持约32.03%的相对酶活力, ApkAdsA180K的相对酶活力为49.04%。

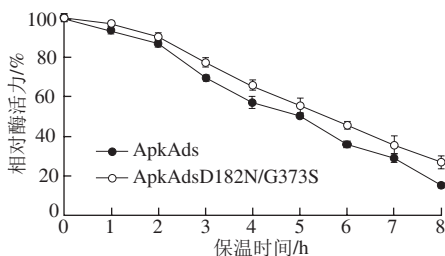


图10 90 °C重组 α -淀粉酶的热稳定性
Fig. 10 Thermal stability of α -amylases at 90 °C

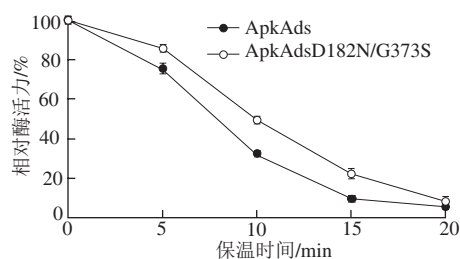


图11 100 °C重组 α -淀粉酶的热稳定性
Fig. 11 Thermal stability of α -amylases at 100 °C

3 讨论

极端嗜热酸性 α -淀粉酶具有反应温度高、液化速度快、热稳定性好、酸性条件下酶活力高等优点, 在淀粉液化工艺中具有巨大的应用前景^[11-12]。但是极端嗜热酸性 α -淀粉酶不易从极端嗜热微生物中大量获得, 这限制了它在淀粉液化工艺中的应用^[13-14]。因此将极端嗜热酸性 α -淀粉酶的基因在常温表达宿主如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、酵母等进行表达, 以大量获得适用于淀粉液化工艺的重组 α -淀粉酶具有重要的实际意义。由于极端嗜热微生物与常温微生物的密码子偏好性差别较大, 采用常温微生物作为极端嗜热酸性 α -淀粉酶的表达宿主存在表达量低、不可溶性表达或催化活性下降等缺陷^[24]。本研究根据*Pichia pastoris*的密码子偏好性^[23], 经密码子优化设计, 采用化学合成方法合成极端嗜热酸性 α -淀粉酶ApkA的基因*ApkA*, 引入载体pPIC9K中, 将重组质粒转化*Pichia pastoris* GS115, 获得酵母工程菌株。重组 α -淀粉酶ApkAds受到甲醇的严格调控和诱导, 在*Pichia pastoris* GS115中大量表达并分泌到胞外, 在诱导培养5 d后发酵上清液中 α -淀粉酶酶活力达到最大值。酵母细胞表达得到的重组 α -淀粉酶ApkAds与大肠杆菌表达得到的重组 α -淀粉酶ApkAds的酶学性质基本一致^[15]。但是该酵母工程菌株表达产生的重组 α -淀粉酶ApkAds能够有效地分泌到胞外, 避免了纯化过程中细胞破碎的步骤, 为蛋白质纯化提供了便利, 更适用于工业应用。

糖基化修饰影响酶分子的折叠、组装、分泌等, 从而改变酶分子的定位、催化活性、稳定性等^[25]。已有研究表明糖基化修饰会对 α -淀粉酶的酶学性质产生影响。例如柯涛等在*Pichia pastoris* GS115中表达嗜热酸性 α -淀粉酶BD5088, 发现糖基化修饰可以提高BD5088的热稳定性、最适反应温度和酸性条件下酶活力^[26]。Tull等^[27]发现N-糖基化修饰有利于提高来源于芽孢杆菌*Bacillus* strain NCIB 12513的 α -淀粉酶ABA在酸性条件下的活性, 但不利于其维持热稳定性。本研究通过对比ApkA和与其氨基酸序列同源性高达89%的极端嗜热酸性 α -淀粉酶PFA的氨基酸序列, 选取氨基酸残基D182和G373为突

变位点, 构建含有两个潜在N-糖基化修饰位点的突变体ApkAdsD182N/G373S, 并在*Pichia pastoris* GS115中表达该突变体, 获得重组 α -淀粉酶ApkAdsD182N/G373S。突变体ApkAdsD182N/G373S在酵母细胞中的表达情况与野生型ApkAds基本一致, 但是其酶学性质发生了一定的变化。SDS-PAGE分析结果显示ApkAds的表现分子质量约为45 kD, 经N-糖基化修饰的ApkAdsD182N/G373S的表现分子质量约为55 kD。与ApkAds相比, ApkAdsD182N/G373S的最适反应pH值由6.5降至5.5~6.0, 于pH 4.5~7.5之间的相对酶活力由40%以上增加至60%以上; 在90℃和100℃条件下, 酸性条件下稳定性得到提高; 最适反应温度由90℃提高至100℃, 并且于50~110℃的酶活力均高于ApkAds; 于90℃的半衰期由5 h增加至5.5 h, 于100℃保温10 min后的相对酶活力由32.03%增加至49.04%。以上结果表明, N-糖基化修饰有利于提高ApkA在酸性条件下酶活力和稳定性、最适反应温度及热稳定性。本研究所获得的经N-糖基化修饰的突变体ApkAdsD182N/G373S的高温活性、稳定性、酸性条件下的酶活力和稳定性等酶学性质达到了淀粉液化工艺对 α -淀粉酶的要求, 能够适用于淀粉液化工艺。

参考文献:

- [1] SHARMA A, SATYANARAYANA T. Microbial acid-stable α -amylases: characteristics, genetic engineering and applications[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(2): 201-211. DOI:10.1016/j.procbio.2012.12.018.
- [2] JANEČEK Š, SVENSSON B, MacGREGOR E A. α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(7): 1149-1170. DOI:10.1007/s00018-013-1388-z.
- [3] KUMARI A, SINGH K, M KAYASTHA A. α -Amylase: general properties, mechanism and biotechnological applications-a review[J]. Current Biotechnology, 2012, 1(1): 98-107. DOI:10.2174/2211551X11201010098.
- [4] SOUZA P M. Application of microbial α -amylase in industry-a review[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2010, 41(4): 850-861. DOI:10.1590/S1517-83822010000400004.
- [5] RANA N, WALIA A, GAUR A. α -Amylases from microbial sources and its potential applications in various industries[J]. National Academy Science Letters, 2013, 36(1): 9-17. DOI:10.1007/s40009-012-0104-0.
- [6] GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(11): 1599-1616. DOI:10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- [7] ATOMI H, SATO T, KANAI T. Application of hyperthermophiles and their enzymes[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(5): 618-626. DOI:10.1016/j.copbio.2011.06.010.
- [8] PRAKASH O, JAISWAL N. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 160(8): 2401-2414. DOI:10.1007/s12010-009-8735-4.
- [9] KONSOLA Z, LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(1): 150-157. DOI:10.1016/j.biortech.2005.11.001.
- [10] ZHOU W, YOU C, MA H W, et al. One-pot biosynthesis of high-concentration α -glucose 1-phosphate from starch by sequential addition of three hyperthermophilic enzymes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1777-1783. DOI:10.1021/acs.jafc.5b05648.
- [11] DALMASO G Z L, FERREIRA D, VERMELHO A B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications[J]. Marine Drugs, 2015, 13(4): 1925-1965. DOI:10.3390/md13041925.
- [12] UNSWORTH L D, van der OOST J, KOUTSOPOULOS S. Hyperthermophilic enzymes-stability, activity and implementation strategies for high temperature applications[J]. FEBS Journal, 2007, 274(16): 4044-4056. DOI:10.1111/j.1742-4658.2007.05954.x.
- [13] HITESH K, GUPTA R. Thermal adaptation of α -amylases: a review[J]. Extremophiles, 2014, 18(6): 937-944. DOI:10.1007/s00792-014-0674-5.
- [14] 曾静, 郭建军, 邱小忠, 等. 极端嗜热微生物及其高温适应机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 30-37. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.09.005.
- [15] TACHIBANA Y, LECLERE M M, FUJIWARA S, et al. Cloning and expression of the α -amylase gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. KOD1, and characterization of the enzyme[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1996, 82(3): 224-232. DOI:10.1016/0922-338X(96)88812-X.
- [16] van der MAAREL M J E C, van der VEEN B, UITDEHAAG J C M, et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 94(2): 137-155. DOI:10.1016/S0168-1656(01)00407-2.
- [17] GREEN M R, SAMBROOK J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012: 79-81.
- [18] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685. DOI:10.1038/227680a0.
- [19] 梁晓亮. 嗜热蛋白酶WF146的抗自降解研究及其应用[D]. 武汉: 武汉大学, 2010: 101-105.
- [20] BERNFELD P. Amylases, α and β [J]. Methods in Enzymology, 1955, 1: 149-158.
- [21] JØRGENSEN S, VORGIAS C E, ANTRANIKIAN G. Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular α -amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(26): 16335-16342. DOI:10.1074/jbc.272.26.16335.
- [22] 郭建强, 李运敏, 岳丽丽, 等. 超耐热酸性 α -淀粉酶基因的克隆及其在酵母细胞中的表达[J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 237-242. DOI:10.13345/j.cjb.2006.02.012.
- [23] SHARP P M, TUOHY T M F, MOSURSKI K R. Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(13): 5125-5143. DOI:10.1093/nar/14.13.5125.
- [24] GUSTAFSSON C, GOVINDARAJAN S, MINSHULL J. Codon bias and heterologous protein expression[J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(7): 346-353. DOI:10.1016/j.tibtech.2004.04.006.
- [25] RYŠLAVÁ H, DOUBNEROVÁ V, KAVAN D, et al. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly[J]. Journal of Proteomics, 2013, 92: 80-109. DOI:10.1016/j.jprot.2013.03.025.
- [26] 柯涛, 熊蓝, 张乃群, 等. 合成嗜热酸性淀粉酶的毕赤酵母表达[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(1): 30-35. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2012.01.002.
- [27] TULL D, GOTTSCHALK T E, SVENDSEN I. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic *Bacillus* α -amylase produced in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2001, 21(1): 13-23. DOI:10.1006/prep.2000.1348.