

N 端截短对嗜酸普鲁兰芽孢杆菌普鲁兰酶酶学特性及功能的影响

陈阿娜^{1,2}, 刘秀霞¹, 戴晓峰¹, 詹锦玲¹, 彭枫¹, 李璐¹, 王芬¹, 李松², 杨艳坤¹, 白仲虎¹

1 江南大学 生物工程学院 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000

陈阿娜, 刘秀霞, 戴晓峰, 等. N 端截短对嗜酸普鲁兰芽孢杆菌普鲁兰酶酶学特性及功能的影响. 生物工程学报, 2016, 32(3): 355-364.

Chen AN, Liu XX, Dai XF, et al. Effect of N-terminal truncation of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on enzyme properties and functions. Chin J Biotech, 2016, 32(3): 355-364.

摘要: 采用 N 端截短方式对嗜酸普鲁兰芽孢杆菌 *Bacillus acidopullulyticus* 普鲁兰酶进行分子精简, 构建不同形式的 N 端截短突变体, 考察截短突变对表达水平、酶学特性及实用性能的影响。研究表明: 缺失 X45 后, 目标蛋白几乎全部以不溶形式的包涵体形式存在; 缺失 CBM41 可引起可溶性表达量的大幅提升。缺失 CBM41 (M1)、X25 (M3)、亦或两结构域同时缺失 (M5) 的变体最适温度 (60 °C) 和最适 pH (5.0) 与野生型相同。突变体 M1 和 M5 的 K_m 值分别提高至野生型的 2.4 倍和 3.1 倍, k_{cat}/K_m 测定结果显示 M5 催化效率下降明显。突变体 M1、M3 和 M5 对分子量较大底物的水解效率略有下降, 但对小分子底物的水解效率影响不明显。野生型及突变体 M1、M3 和 M5 与糖化酶复配使用时, 糖化值 (DE) 分别为 93.6%、94.7%、94.5%和 93.1%。上述结果表明, 切除 CBM41 和/或 X25 结构域的普鲁兰酶变体不影响其在淀粉糖化过程中的应用, 且由于分子量减小更易于异源表达, 截短突变体可能更适合于工业化生产。

关键词: N 端截短, 普鲁兰酶, 表达水平, 酶学特性, 应用

Received: July 13, 2015; **Accepted:** September 8, 2015

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2013CB733602), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2015AA020802), Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP51401A), Provincial Natural Science Foundation for the Youth of Anhui province of China (No. 1408085QC61).

Corresponding authors: Yankun Yang. Tel/Fax: +86-510-85319306; E-mail: yangyankun@jiangnan.edu.cn

Zhonghu Bai. Tel/Fax: +86-510-85319306; E-mail: baizhonghu@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2013CB733602), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2015AA020802), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP51401A), 安徽省自然科学基金青年基金 (No. 1408085QC61) 资助。

网络出版时间: 2015-12-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20151222.1416.002.html>

Effect of N-terminal truncation of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on enzyme properties and functions

A'na Chen^{1,2}, Xiuxia Liu¹, Xiaofeng Dai¹, Jinling Zhan¹, Feng Peng¹, Lu Li¹, Fen Wang¹, Song Li², Yankun Yang¹, and Zhonghu Bai¹

¹ National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² School of Biochemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

Abstract: We constructed different N-terminal truncated variants based on *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase 3D structure (PDB code 2WAN), and studied the effects of truncated mutation on soluble expression, enzymatic properties, and application in saccharification. Upon expression, the variants of X45 domain deletion existed as inclusion bodies, whereas deletion of CBM41 domain had an effective effect on soluble expression level. The variants that lack of CBM41 (M1), lack of X25 (M3), and lack both of CBM41 and X25 (M5) had the same optimal pH (5.0) and optimal temperature (60 °C) with the wild-type pullulanase (WT). The K_m of M1 and M5 were 1.42 mg/mL and 1.85 mg/mL, respectively, 2.4- and 3.1-fold higher than that of the WT. k_{cat}/K_m value of M5 was 40% lower than that of the WT. Substrate specificity results show that the enzymes exhibited greater activity with the low-molecular-weight dextrin than with high-molecular-weight soluble starch. When pullulanases were added to the saccharification reaction system, the dextrose equivalent of the WT, M1, M3, and M5 were 93.6%, 94.7%, 94.5%, and 93.1%, respectively. These results indicate that the deletion of CBM41 domain and/or X25 domain did not affect the practical application in starch saccharification process. Furthermore, low-molecular-weight variants facilitate the heterologous expression. Truncated variants may be more suitable for industrial production than the WT.

Keywords: N-terminal truncation, pullulanase, expression level, enzyme properties, application

普鲁兰酶是一类淀粉脱支酶，可高效切割多聚葡萄糖类底物分支部位的 α -1,6-糖苷键^[1]。该酶常与糖化酶复配使用，应用于淀粉糖化过程中：普鲁兰酶切割淀粉 α -1,6-糖苷键分支点，糖化酶切割 α -1,4-糖苷键连接的线性低聚糖^[2-3]。两者协同作用可有效提高淀粉利用率和糖化得率，并显著缩短糖化时间^[4-5]。在特定条件下，普鲁兰酶具有反向合成 α -1,6-糖苷键功能，可用于获得具有特殊结构和功能的多糖^[6-7]，在制药领域具有潜在的应用价值。目前已获得许多微生物编码的普鲁兰酶^[8-11]，其中来源于嗜酸普鲁兰芽孢杆菌 *Bacillus acidopullulyticus* 的

普鲁兰酶 (*BaPul*) 酶学性质 (主要是耐热、耐酸性和比酶活) 能较好地满足淀粉糖化过程需求，已实现工业化生产^[12]。

BaPul 成熟蛋白由 921 个氨基酸组成，各结构域的连接顺序为 CBM41-X45a-X25-X45b-CBM48-GH13。CBM 为碳水化合物结合结构域，X 是未知功能结构域，GH13 是 CAZY GH13 结构域，其本身由 GH13 家族 (又称 α -淀粉酶家族) 典型的 A、B 和 C 三个结构域组成^[13-16]。空间结构上，CBM48 和 GH13 结合紧密，它们组成的结构与异淀粉酶相似，可能具有淀粉脱支酶完整的催化功能；处于 N 端的 CBM41、X45

和 X25 与催化功能域连接较为松散, 推测这 3 个结构域可能与大分子底物的结合相关。对其他种属的 I 型普鲁兰酶研究表明, N 端结构域的切除并不影响普鲁兰酶对小分子糊精的脱支功能, 不影响普鲁兰酶在淀粉糖化过程中的实际应用^[17-19]。

因而当前工作中, 我们依据 *BaPul* 3D 结构 (PDB code 2WAN) 构建不同形式的 N 端截短突变体, 对比考察截短突变体与野生型普鲁兰酶 (WT) 在可溶性表达水平、酶学特性和淀粉糖化过程中应用的差异。为优化/简化 *BaPul* 编码基因, 解析结构域与功能的关系以及探索酶与底物协同作用机制等方面的研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和基因

大肠杆菌 BL21 (DE3) 和质粒 *pelB*-pET28a (+) 分别用于普鲁兰酶及其截短突变体基因重组表达的宿主菌和质粒。*pelB*-pET28a (+) 的质粒骨架是 pET28a (+), *pelB* 信号肽来源于 pET22b (+)。构建过程中将 pET28a (+) 上 *Bgl* II 到 *Xho* I 之间的片段替换为 pET22b (+) 上的等位片段。*BaPul* 全长基因 (GenBank Accession No. Ax203843.1) 及其截短突变体基因由 Invitrogen 上海公司合成, 并连接于 pMD18-T 载体上。

1.2 重组载体的构建

以含有目标基因的 pMD18-T 载体为模板, 通过 PCR 方法扩增出目标基因。PCR 反应条件为: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 8 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1-2 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 2 min。采用限制性内切酶 *Nde* I 及 *Xho* I 对扩增产物及 *pelB*-pET28a (+) 表达载体

进行双酶切。酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接后, 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞。所用引物及其相关信息见表 1。

1.3 培养基和发酵条件

种子培养基采用 LB: 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母浸出物, 和 10 g/L NaCl。发酵培养基采用改进的 TB: 12 g/L 蛋白胨, 24 g/L 酵母浸出物, 2.31 g/L KH_2PO_4 , 9.85 g/L K_2HPO_4 , 和 10 g/L 甘油, pH 7.0。10 mL 培养基装入 100 mL 三角瓶中灭菌, 并在使用前加入卡那霉素至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

取 -80 °C 保存的菌种按 0.1% 的接种量接入种子培养基中, 置于摇床上 37 °C、230 r/min 培养 10 h。取种子培养液按 1% 的接种量接入发酵培养基中, 置于摇床上 37 °C、230 r/min 培养 5.5 h (此时的 OD_{600} 约为 5-6); 加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 并下调培养温度至 20 °C, 诱导目标蛋白表达, 诱导时间 18-20 h。

1.4 组分分离

取 1.0 mL 发酵终点的发酵液, 4 000 \times g、4 °C 离心 30 min。收集离心上清并定义该组分为胞外组分。将离心所得菌体用 10 mmol/L PBS (pH 7.4) 稀释至 OD_{600} = 4.0-5.0 后, 用超声破碎方法破碎菌体。超声条件为 25% 功率, 超 2 s 停 2 s, 总超声时间 6 min。将超声破碎液 12 000 \times g、4 °C 离心 10 min, 收集离心上清定义为胞内可溶组分和离心碎片定义为胞内不溶组分^[20]。所有组分之和为全细胞蛋白。

1.5 酶活分析

普鲁兰酶酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸方法 (简称 DNS 方法)^[21]。取适当稀释的酶

表 1 野生型及其截短突变体扩增用引物

Table 1 List of nucleotide sequences used in this study

Primer name	Nucleotide sequence (5'-3') ^a	Gene
WT[F] ^b	GGGAATTCC <i>ATATG</i> GATTCTACTTCGACTAAAGTTATTGTTCC	<i>BaPul</i>
M1[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> CCCATCTGTTTCAAATGCCTATCTTG	<i>BaPul-ΔCMB41</i>
M2[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> GATTCTACTTCGACTAAAGTTATTGTTCC	<i>BaPul-ΔX45</i>
M3[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> GATTCTACTTCGACTAAAGTTATTGTTCC	<i>BaPul-ΔX25</i>
M4[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> GTAACTGCCGTTCTTGTTGGAGATTAC	<i>BaPul-ΔCMB41ΔX45</i>
M5[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> CCCATCTGTTTCAAATGCCTATCTTG	<i>BaPul-ΔCMB41ΔX25</i>
M6[F]	GGGAATTCC <i>ATATG</i> GATTCTACTTCGACTAAAGTTATTGTTCC	<i>BaPul-ΔX25ΔX45</i>
[R] ^c	CCG <i>CTCGAG</i> TGTTTGAGAATAAGCGTACTTATAG	

^a Italicized fonts indicate the recognition sites of the corresponding restriction enzymes. ^b [F] and [R] mean the forward and reverse primers, respectively. ^c The reverse primers of all variants are the same.

液 0.1 mL 加入到 1.9 mL 1% 的普鲁兰溶液中，置于 60 °C 水浴中温浴 10 min，迅速加入 3 mL DNS 试剂终止酶解反应，并于沸水浴中煮沸 7 min 进行显色反应。将上述反应液置于冰水中冷却，并加入 20 mL 蒸馏水，混匀后于 540 nm 测定吸光度值。采用 pH 5.0 的醋酸-醋酸钠配制 1% 的普鲁兰溶液。1 个酶活力单位定义为上述测定条件下，每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量（还原糖以葡萄糖为标准计）。

1.6 蛋白质纯化及定量

目标蛋白 C 端连接 His-tag，纯化采用 Ni²⁺ 柱亲和层析方法，具体操作参见文献[22]。蛋白纯度采用 SDS-PAGE 分析。蛋白定量采用 Bradford 方法^[23]，具体操作参见改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（生工生物工程上海股份有限公司）。

1.7 最适 pH 及酸碱稳定性

最适 pH 测定采用不同 pH 值的缓冲液配制 1% 的普鲁兰溶液、重悬和稀释酶液，用于酶活测定。酸碱稳定性测定采用不同 pH 值的缓冲液重悬和稀释酶液，于 4 °C 冰箱放置 24 h，在标

准条件下测定酶活。以最高酶活为 100%，其余 pH 值下的酶活以相对百分比表示。各 pH 值所用缓冲液：甘氨酸-盐酸（pH 3.0，100 mmol/L），柠檬酸-柠檬酸钠（pH 3.5 和 5.5，100 mmol/L），醋酸-醋酸钠（pH 4.0–5.0，100 mmol/L），和 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄（pH 6.0–7.5，100 mmol/L）。

1.8 最适温度及热稳定性

最适温度的测定在水浴温度为 40–80 °C 条件下测定酶活，其余参数同标准条件。温度稳定性测定时将酶液在 60 °C 温浴，每隔一定时间取样测定残余酶活。以未经温浴的酶液酶活作为 100%，其余酶活以相对百分比表示。以 ln（残余酶活%）对温浴时间作图，采用线性回归方法求得一级反应速率常数 k_d 。半衰期 $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$ ^[24]。

1.9 动力学参数

用 100 mmol/L 的醋酸-醋酸钠（pH 5.0）配制浓度为 0.25–16.0 mg/mL（0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、14.0 和 16.0）的普鲁兰溶液，并在标准条件下测定酶活^[25]。以反应速率对底物浓度作图，采用非线性回归方法求得 V_{max} 和 K_{mo} $k_{cat} = V_{max} / [E]$ ，其中 [E] 是酶浓度。

1.10 底物特异性及应用

用于测定底物特异性的底物浓度为 0.25%。以普鲁兰为底物时的酶活计为 100%，其余酶活以相对百分比表示。

配制干基浓度为 30% 的玉米淀粉乳 (按 15 L 配制), 调节 pH 值至 5.5–6.2, 加入 1 mmol/L 氯化钙, 加入高温酸性 α -淀粉酶 (10–15 U/g 干基), 在剧烈搅拌下, 先加热至 72 °C, 保温 15 min, 再加热至 95 °C, 并维持 60 min, 以达到所需的液化程度 (DE 值: 12–15%), 碘反应呈棕红色。液化结束后, 迅速将料液用盐酸将 pH 调至 4.2–4.5, 并升温至 120 °C, 保持 10 min, 以灭活酶。糖化过程温度下调为 60 °C, 加入糖化酶 (120 U/g 干基) 和普鲁兰酶 (0.5 U/g 干基)。60 °C 保温若干小时后, 当用无水酒精检验无糊精存在时, 糖化过程结束。将料液 pH 调至 5.0, 同时在沸水浴中煮沸 10 min, 以灭活酶^[26]。

2 结果与讨论

2.1 截短突变体的设计

依据 *BaPul* 的 3D 结构设计了 6 种截短突变体, 分别是缺失 CBM41 的变体 M1, 缺失 X45 (包括 X45a 和 X45b) 的变体 M2, 缺失 X25 的变体 M3, 缺失 CBM41 和 X45 的变体 M4, 缺失 CBM41 和 X25 的变体 M5, 和缺失 X45 和 X25 的变体 M6。野生型及其截短突变体一级结构连接顺序及各结构域的划分见图 1。

2.2 表达效果检测

将野生型普鲁兰酶及截短突变体的编码基因亚克隆至 *pelB*-*pET28a* (+), 并转化至 BL21 (DE3) 中进行诱导表达。由于缺乏信号肽引导, 所有目标蛋白定位于细胞质中, 发酵液上清中无可检测酶活。发酵终点时缺失 CBM41 的 M1 和 M5 酶活高于其他重组菌株, 分别达到 84.6 U/mL

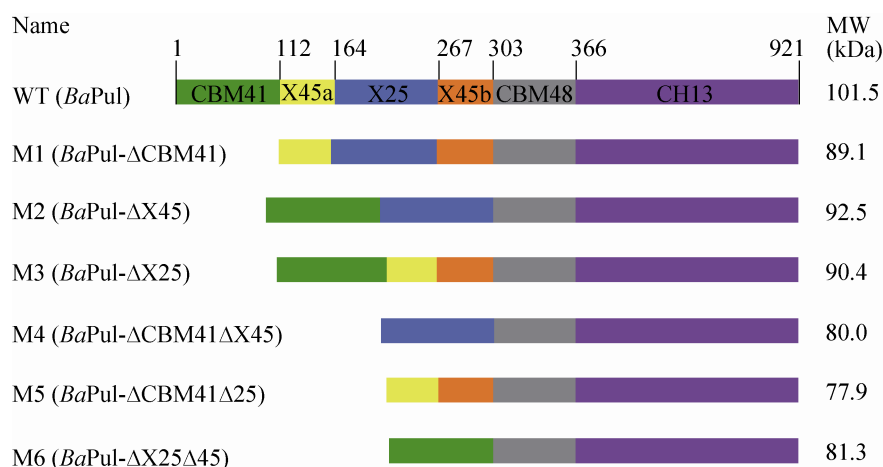


图 1 野生型及其截短突变体结构示意图

Fig. 1 Schematic representation of the WT and the variants. Different color represents different structural domain. Numbers represent the first residues of each domain. The names of the variants are indicated on the left. The predicted molecular sizes are indicated on the right.

和 71.0 U/mL, 野生型酶活仅为 29.1 U/mL, 缺失 X25 的 M3 酶活与野生型相当。M2、M4 和 M6 发酵液上清和胞内均未检测到酶活, 这 3 个重组菌株的共同特征是切除了 X45 结构域。SDS-PAGE 电泳结果显示, M1 和 M5 的可溶性表达量明显高于 M3 和 WT; 缺失 X45 的 M2、M4 和 M6 可溶性蛋白少 (图 2)。X45 结构域可能在促进催化结构域正确折叠或维持催化结构域正确构象中发挥作用^[17]。后续实验将不再涉及这 3 个突变体。

2.3 酶的纯化及比酶活的测定

为研究酶学特性的变化, 对野生型及其截短突变体进行了纯化。细胞经超声破碎后, 12 000 × g、4 °C 离心 10 min, 去除细胞碎片及不溶物, 离心上清过 Ni⁺柱进行纯化。SDS-PAGE 分析结果显示目标蛋白实现电泳纯, 可用于酶学性质的测定 (图 3)。纯化后产物的比酶活测定结果表明截短突变体与野生型酶差异较小,

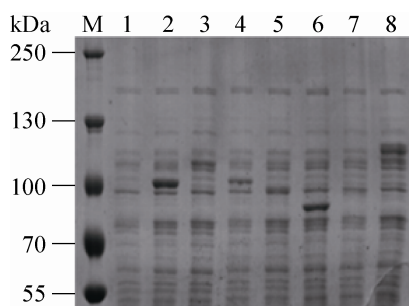


图 2 野生型普鲁兰酶及其截短突变体全细胞蛋白的可溶性组分 SDS-PAGE

Fig. 2 The total cell protein SDS-PAGE analysis of the WT and the variants. M: protein molecular mass markers; 1: control (vector pET28a(+)) without foreign gene); 2: M1; 3: M2; 4: M3; 5: M4; 6: M5; 7: M6; 8: WT. The values are molecular sizes in kilodaltons.

因而总酶活比值可近似代表表达量比值。蛋白定量结果表明可溶性蛋白表达量差异较为明显, 如 M1 和 M5 的表达量分别是野生型的 2.7 倍和 2.1 倍 (表 2)。M1 和 M5 酶活提高倍数与表达量提高倍数相当。以上结果表明酶活升高主要是可溶性表达量升高引起的。

2.4 最适 pH 及酸碱稳定性

截短突变对最适 pH 的影响较小, 野生型与各突变体最适 pH 曲线变化趋势几乎相同, M1、

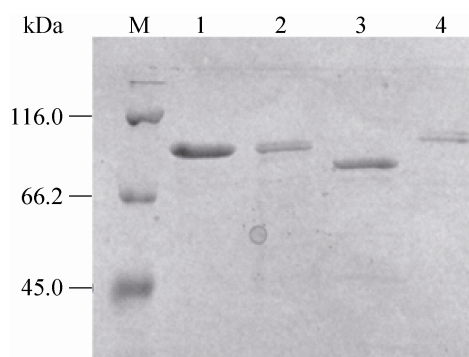


图 3 野生型普鲁兰酶及其截短突变体纯化后 SDS-PAGE

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified WT and variants. M: protein molecular mass markers; 1: M1; 2: M3; 3: M5; 4: WT. The values are molecular sizes in kilodaltons.

表 2 野生型普鲁兰酶及其截短突变体可溶性蛋白定量及比酶活

Table 2 Specific activity and protein concentration of the WT and the variants

Variants	Soluble enzyme (μg/mL)	Specific activity (U/mg)
M1 (ΔCBM41)	72.5 ± 2.2	1167.3 ± 35.0
M3 (ΔX25)	31.7 ± 0.7	1124.4 ± 24.7
M5 (ΔCBM41ΔX25)	55.9 ± 1.8	1271.1 ± 41.9
WT	26.6 ± 0.5	1096.5 ± 21.9

M3、M5 和野生型的最适 pH 为 5.0。然而,不同突变体的酸碱稳定性有明显差异,尤其是当 pH 值低于最适 pH 值时。如在 pH 3.0 时, M5 (Δ CBM41 Δ X25) 的残余酶活不足 70%, 而其余突变体的残余酶活均高于 80%。当 pH 值偏酸性时, M1 变体的稳定性优于野生型 (图 4)。上述结果表明, X25 结构域可能对野生型普鲁兰酶在维持酸碱稳定性方面发挥正向促进作用, 而 CBM41 结构域可能不利于维持酸碱稳定性。

2.5 最适温度及热稳定性

如图 5 所示, M1、M3 和 M5 的最适温度 ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$) 与野生型相同。在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, M1、M3、M5 和 WT 的相对酶活分别为 82%、80%、87% 和 63%。该结果表明, 突变体比野生型具有较好的耐热性。热稳定性测试结果表明切除 CBM41 变体的半衰期都有所延长, 如 M1 和 M5 的半衰期分别是野生型的 1.3 倍和 1.2 倍。切除 X25 对热稳定性的影响不大 (表 3)。

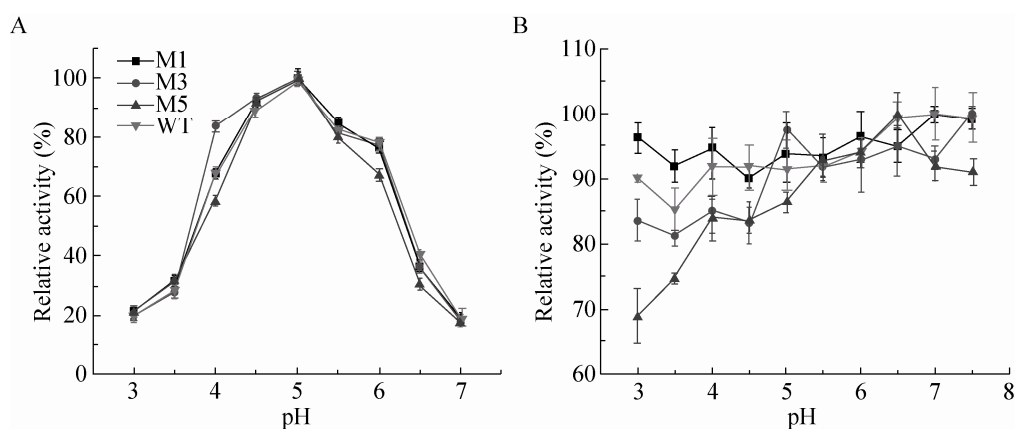


图 4 野生型及其截短突变体的最适 pH 及酸碱稳定性

Fig. 4 The optimal pH and pH stability of the WT and the variants. (A) Optimal pH. (B) pH stability.

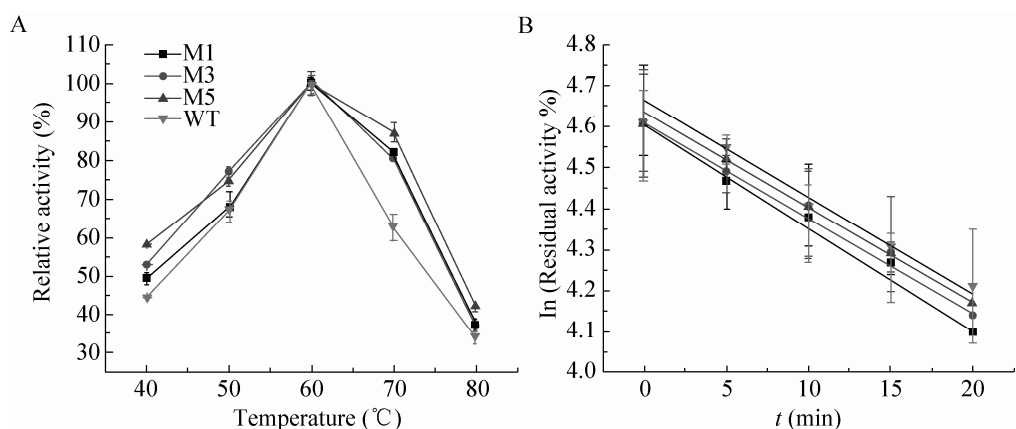


图 5 野生型及其截短突变体的最适温度及热稳定性

Fig. 5 The optimal temperature and thermostability of the WT and the variants. (A) Optimal temperature. (B) Thermostability.

表 3 野生型普鲁兰酶及其截短突变体半衰期

Table 3 Half-life of the WT and the variants

Variants	Half-life (min)
M1 (Δ CBM41)	43.7
M3 (Δ X25)	31.1
M5 (Δ CBM41 Δ X25)	40.3
Wide-type	34.4

根据已解析的 *BaPul* 3D 结构, 普鲁兰酶的 N 端结构域与催化功能域连接较为松散, 尤其是 CBM41 结构域甚至不能以晶体形式呈现^[13]。这些柔性结构域可能会对普鲁兰酶整体的热稳定性造成一定的负面影响。前期工作中, 我们通过定点突变 CBM41 结构域中柔性氨基酸, 提高了野生型普鲁兰酶的热稳定性^[22]。结合本次实验结果我们提出: 通过删除或替换蛋白分子结构中的柔性区域, 可以有效提高蛋白的热稳定性。

2.6 酶促动力学参数

M1 和 M5 变体的 K_m 值分别比野生型提高

了 2.4 倍和 3.1 倍, M3 变体的 K_m 值变化不明显。该结果表明截短的 CBM41 有助于大分子普鲁兰与酶结合 (K_m 值越小表示酶对底物的亲和力越大), X25 也可能发挥相似的作用。 k_{cat}/K_m 测定结果显示 M5 催化效率下降明显, M1 和 M3 与野生型相当。结构变化引起功能变化的机制目前尚不清楚, 有待于进一步分析。

2.7 底物特异性及应用

所有普鲁兰酶的最适底物是普鲁兰多糖; 所有普鲁兰酶对高度分支的糖原没有水解活性。所有突变体对小分子糊精的相对活性比野生型略有下降, 对分子量较大的可溶性淀粉下降较为明显 (表 5)。上述结果表明, CBM41 和未知功能的 X25 有助于酶与底物结合, 尤其是对大分子底物。N 端结构域的切除并不影响普鲁兰酶对小分子糊精的脱支功能, 但是是否影响在淀粉糖化过程中的实际应用仍需实验检验。

表 4 野生型普鲁兰酶及其截短突变体动力学常数

Table 4 Kinetic parameters of the WT and the variants

Kinetic parameter	M1	M3	M5	WT
K_m (mg/mL)	1.42±0.22	0.69±0.08	1.85±0.10	0.60±0.16
k_{cat}/K_m (mL/(mg·s))	1313.0±55.1	1372.5±83.6	946.8±35.0	1473.29±44.2

表 5 野生型普鲁兰酶及其截短突变体底物特异性

Table 5 Substrate specificity of the WT and the variants

Substrate	Relative activity (%)			
	M1	M3	M5	WT
Pullulan	100±1.8	100±1.0	100±0.8	100±0.4
Dextrin	44.7±0.6	41.2±1.0	38.6±1.2	49.4±1.2
Soluble starch	31.3±0.9	36.7±0.3	27.4±1.2	46.9±0.8
Glycogen	—	—	—	—

—: below the detection line.

糖化终点时, 测定各组料液中 DE 值 (还原性糖以葡萄糖计)。对照组中未添加任何普鲁兰酶变体, 糖化终点时 DE 值为 92.1%。当野生型及突变体 M1, M3 和 M5 与糖化酶复配使用时, 糖化终点时 DE 值分别为 93.6%、94.7%、94.5% 和 93.1%。添加普鲁兰酶可提高糖化得率, 且突变体 M1 和 M3 对 DE 值的贡献高于野生型普鲁兰酶。

3 结论

为解析野生型 *Bacillus acidopullulyticus* 普鲁兰酶结构域与功能的关系, 本文通过蛋白质工程对其 N 端进行了不同形式的截短。研究过程中主要得出以下结论: 缺失 CBM41 可有效提高突变体的酶活; 缺失 X25 对酶活影响不大; 缺失 X45 的突变体丧失了催化活力, 目标蛋白主要以不溶的包涵体形式存在。比酶活测定结果表明截短突变体与野生型酶差异较小, 酶活升高主要是可溶性表达量升高引起的。突变体 M1、M3 和 M5 的最适 pH (5.0) 和最适温度 (60 °C) 与野生型相同; 突变体 M1、M3 和 M5 对小分子葡聚多糖底物的水解效率影响较小, 上述结果表明切除 CBM41 和 X25 结构域的普鲁兰酶突变体不影响其在淀粉糖化过程中的应用。

REFERENCES

- [1] Singh RS, Saini GK, Kennedy JF. Continuous hydrolysis of pullulan using covalently immobilized pullulanase in a packed bed reactor. *Carbohydr Polym*, 2011, 83(2): 672–675.
- [2] Nie Y, Yan W, Xu Y, et al. High-level expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli* with auto-induction: effect of lac operator. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e78416.
- [3] Talekar S, Pandharbale A, Ladole M, et al. Carrier free co-immobilization of alpha amylase, glucoamylase and pullulanase as combined cross-linked enzyme aggregates (combi-CLEAs): a tri-enzyme biocatalyst with one pot starch hydrolytic activity. *Bioresour Technol*, 2013, 147: 269–275.
- [4] Roy I, Gupta MN. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 34(1): 26–32.
- [5] Hii SL, Tan JS, Ling TC, et al. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Res*, 2012, 2012: 921362.
- [6] Kitahata S, Tanimoto T, Okada Y, et al. Synthesis of novel heterobranching β -cyclodextrins from α -D-mannosyl-maltotriose and β -cyclodextrin by the reverse action of pullulanase, and isolation and characterization of the products. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(11): 2406–2411.
- [7] Yim DK, Park YH, Park YH. Production of branched cyclodextrins by reverse reaction of microbial debranching enzymes. *Starch-Stärke*, 1997, 49(2): 75–78.
- [8] Chen WB, Nie Y, Xu Y. Signal peptide-independent secretory expression and characterization of pullulanase from a newly isolated *Klebsiella variicola* SHN-1 in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(1): 41–54.
- [9] Bertoldo C, Armbrecht M, Becker F, et al. Cloning, sequencing and characterization of a heat- and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3407–3416.
- [10] Kang JH, Park KM, Choi KH, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(3): 260–266.
- [11] Duffner F, Bertoldo C, Andersen JT, et al. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2000, 182(22): 6331–6338.
- [12] Chen AN, Sun Y, Zhang W, et al. Downsizing a pullulanase to a small molecule with improved soluble expression and secretion efficiency in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 9. doi: 10.1186/s12934-015-0403-5.
- [13] Turkenburg JP, Brzozowski AM, Svendsen A, et al.

- Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Proteins: Struct Funct Bioinform*, 2009, 76(2): 516–519.
- [14] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, et al. The carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl Acids Res*, 2009, 37(Suppl. 1): D233–D238.
- [15] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, 7(5): 637–644.
- [16] Stam MR, Danchin EGJ, Rancurel C, et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Eng Des Sel*, 2006, 19(12): 555–562.
- [17] Duan XG, Wu J. Enhancing the secretion efficiency and thermostability of a *Bacillus deramificans* pullulanase mutant (D437H/D503Y) by N-terminal domain truncation. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(6): 1926–1931.
- [18] England G, Kolkman M, Miller B, et al. Pullulanase variants with increased productivity: US, 7968691. 2011-06-28.
- [19] Teague MW, Brumm PJ, Allen LN, et al. Pullulanase expression constructs containing α -amylase promoter and leader sequences: US, 6300115. 2001-10-09.
- [20] Chen AN, Li YM, Liu XX, et al. Soluble expression of pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus* in *Escherichia coli* by tightly controlling basal expression. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(12): 1803–1810.
- [21] Lappalainen A, Niku-Paavola ML, Suortti T, et al. Purification and characterization of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enzymatic starch modification. *Starch-Stärke*, 1991, 43(12): 477–482.
- [22] Chen AN, Li YM, Nie JQ, et al. Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using *in silico* data driven rational design methods. *Enzyme Microb Technol*, 2015, 78: 74–83.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [24] Kim HS, Le QAT, Kim YH. Development of thermostable lipase B from *Candida antarctica* (CalB) through *in silico* design employing B-factor and RosettaDesign. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 47(1/2): 1–5.
- [25] Malle D, Itoh T, Hashimoto W, et al. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2006, 62(Pt 4): 381–384.
- [26] Svendsen A. Pullulanase variants and methods for preparing such variants with predetermined properties: US, 7906306. 2011-03-15.

(本文责编 郝丽芳)