

文章编号: 1673-1689(2011)05-0716-07

# 米根霉 $\alpha$ 淀粉酶基因的克隆与表达

李松, 王正祥\*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以博德研究公布的米根霉基因组信息为基础设计引物, 分别从两株米根霉中克隆得到大小为 1 386 bp 的  $\alpha$  淀粉酶编码基因。通过比对分析发现该淀粉酶基因内部不含内含子, 两条基因的相似度为 95.54%, 基因编码产物相似度为 97.84%。基因编码产物属于淀粉酶家族 13 成员, 具有淀粉酶家族所特有的 4 个典型的高度保守区域。以质粒载体 pET-28a (+) 为基础构建相关表达载体, 实现了两个淀粉酶在 *E coli* 中的功能性表达。两个淀粉酶在 *E coli* BL21 (DE3) codon-Plus 宿主中的表达量相对较高, 分别为 1.3 U/mL 和 0.5 U/mL。其中一个淀粉酶经 Ni 亲和柱纯化后, 用于进行(马铃薯)淀粉水解实验, 终产物中葡萄糖质量浓度约为 10 g/dL, 麦芽糖质量浓度约为 74 g/dL, 其它低聚糖含量较少。

**关键词:** 米根霉; 真菌  $\alpha$  淀粉酶; 大肠杆菌; 基因表达

中图分类号: Q 785

文献标识码: A

## Gene Cloning and Expression of *Rhizopus oryzae* $\alpha$ -Amylase

LI Song, WANG Zheng-xiang\*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Based on *Rhizopus oryzae* complete genome sequence published by Broad Institute, two 1389bp gene sequences coding  $\alpha$ -amylase were cloned from two *R. oryzae* strains. Sequences alignment indicated that there was no intron existed in the two amylase genes, and the two genes have a similarity of 95.54% and the similarity between the gene products was 97.84%. The gene products belongs to the amylase family 13 and have four classical highly conserved regions that observed in most  $\alpha$ -amylases. Recombinant plasmids for expression of the cloned  $\alpha$ -amylase genes were constructed based on the plasmid vector pET-28a (+).  $\alpha$ -Amylases displayed higher expression levels in *E coli* BL21 (DE3) codon plus strain, the  $\alpha$ -amylase activity were achieved at 1.3 U/mL and 0.5 U/mL, respectively. One of the  $\alpha$ -amylases was purified through Ni affinity column and subsequently used for hydrolyzation of (potato) starch, and there was approximately 10% glucose, 74% maltose and negligible maltotriose or other oligosaccharides remained in the end-products.

**Key words:** *Rhizopus oryzae*, fungal  $\alpha$ -amylase, *Escherichia coli*, gene expression

收稿日期: 2010-09-09

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA020204)。

作者简介: 李松(1980-), 男, 安徽六安人, 发酵工程博士研究生。Email: lisong821123@126.com。

\* 通信作者: 王正祥(1964-), 男, 江苏盐城人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事分子微生物学与生物工程方面的研究。Email: zxwang@jiangnan.edu.cn

真菌  $\alpha$  淀粉酶由于其特有的性质在工业上主要应用在高麦芽糖浆的生产和焙烤制品(对加快生面团的发酵速率、改善面包的结构和体积以、加强面包的口感、色泽和品质等都具有明显的促进作用)等行业,此外在啤酒酿制(提高麦芽汁的可发酵性)、黄酒酿制、(改善酒质,提高出酒率)、生料酒精(有利用对糖化醪中淀粉进行低温液化)以及低聚异麦芽糖生产等行业均有不同程度的应用<sup>[1-2]</sup>。可以产真菌  $\alpha$  淀粉酶的丝状真菌有很多种,包括青霉属<sup>[3]</sup>、曲霉属<sup>[4-5]</sup>和根霉属微生物<sup>[7-9]</sup>等。其中对曲霉属微生物所产的  $\alpha$  淀粉酶的研究较多,目前工业上广泛应用的真菌  $\alpha$  淀粉酶即来源于曲霉属微生物。然而,由于在不同工业过程中所需要的酶的特性差异较大,如在烘焙行业中需要淀粉酶不耐热、易升温失活,在生料酒精行业需要淀粉酶具有生淀粉水解能力,在高麦芽糖浆行业需要淀粉酶尽量耐热耐酸并具有高浓度麦芽糖形成能力等,所以寻找可满足特殊行业需求、具有特殊性质的酶种仍是目前国内外研究者研究的热点之一。

根霉属微生物出现在多种传统发酵食品或饮品当中,有着悠久的历史<sup>[7-8]</sup>。其中,在酒精饮料(印度木菠萝酒、日本米酒或高粱酒)的制作过程

中,根霉属微生物所产的淀粉酶系发挥着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。在现代工业酶制剂的生产当中,根霉属微生物已进入重要生产菌种之列,如在脂肪酶和糖化酶生产中的应用<sup>[7,9]</sup>。虽然根霉属微生物可以同时产生  $\alpha$  淀粉酶和糖化酶,然而目前对根霉属微生物淀粉酶系的研究则主要集中于糖化酶,尤其是对米根霉(*Rhizopus oryzae*)糖化酶的研究或应用较多<sup>[10-11]</sup>,而关于根霉属微生物  $\alpha$  淀粉酶基因的研究报道较少。其中,在国内外的研究当中对米根霉  $\alpha$  淀粉酶基因及其产物性能的研究几乎处于空白状态。

作者以寻找、开发和利用具有新型酶学特性的真菌  $\alpha$  淀粉酶为目的,以美国哈佛-麻省理工学院博德研究所(Broad Institute)公开的米根霉基因组信息([www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu))为参考,对作者所在研究室保藏的两株米根霉菌株来源的  $\alpha$  淀粉酶基因进行克隆并在大肠杆菌中实现了初步表达。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 实验中所使用的菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

Tab. 1 Strains and plasmids

| 菌株和质粒                               | 特 征   | 来源                    |
|-------------------------------------|---|-----------------------|
| <i>R. oryzae</i> CICIM F0071        | 标准菌株  | CICIM-CU <sup>b</sup> |
| <i>R. oryzae</i> CICIM F0072        | 标准菌株  | CICIM-CU              |
| <i>E. coli</i> JM 109               | <i>endA1, recA1, gyrA96, <math>\gamma</math>hi1, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE4, <math>\Delta</math>(proAB, lac), F'(proAB, lac<sup>q</sup>, lacZ<math>\Delta</math>M15), traD</i> | CICIM-CU              |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)           | F-, <i>ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, <math>\lambda</math>(DE3)</i>  | CICIM-CU              |
| <i>E. coli</i> BL21(DE3 codon plus) | F-, <i>ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal, <math>\lambda</math>(DE3), argU, ileY, leuW</i>  | CICIM-CU              |
| pET 28a (+)                         | Kan <sup>r</sup> <sup>a</sup> , 大肠杆菌诱导表达载体  | CICIM-CU              |
| pET28-RoAmy(1/2)                    | pET28a (+) 载体含有 <i>RoAmy1</i> 或 <i>RoAmy2</i> 基因片段  | 本研究                   |

a. Amp<sup>r</sup>: 氨苄青霉素抗性; Kan<sup>r</sup> 卡那霉素抗性; b. 菌株和质粒均由中国高校工业微生物资源和信息中心保藏(CICIM-CU, <http://cicim-cu.jiangnan.edu.cn/>).

1.1.2 培养基和培养条件 LB 培养基: 1 g/dL NaCl, 1 g/dL 蛋白胨, 0.5 g/dL 酵母膏; 向 LB 培养基中添加 1.5 g/dL 琼脂粉即配制成 LB 固体培养基。蓝白平板: LB 固体培养基中添加氨苄青霉素(或卡那霉素)、IPTG 和 X-gal 分别至终质量浓度为 100  $\mu$ g/mL(或 20  $\mu$ g/mL)、40  $\mu$ g/mL 和 40  $\mu$ g/mL。

1.1.3 主要试剂 PCR 产物回收、纯化、质粒的提取等 DNA 操作试剂盒、抗生素和其它生化试剂等: 购自上海生工生物工程技术有限公司或 Qiagen 公司。商品真菌  $\alpha$  淀粉酶(20 000 U/mL): 市场中购买,其生产菌株为曲霉属微生物。

### 1.2 方 法

1.2.1 米根霉染色体 DNA 的提取、质粒 DNA 的

小量制备及 DNA 的酶切、连接、转化等分子操作及 SDS-PAGE 参照文献[12]进行。

**1.2.2  $\alpha$  淀粉酶基因的 PCR 扩增** 根据美国哈佛-麻省理工学院的博德研究所(Broad Institute)公布的 *R. oryzae* 基因组信息(www.broad.mit.edu)为基础设计引物对:

Forward: (5'-ATTGGATCCGTGCCTGT-CATCAA-3')

Reverse: (5'-CTGAAGCTTTTCTTTTGAATATGG-3')

以米根霉染色体 DNA 为模板,使用上述引物及 ExTaq DNA 聚合酶扩增  $\alpha$  淀粉酶基因(*RoAmy*)片段。扩增在 0.2 mL PCR 薄壁管中进行。条件为:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 反应体系参见 DNA 聚合酶使用说明书。PCR 产物使用 Qiagen 公司的 PCR 产物快速纯化试剂盒进行纯化,具体操作步骤参考相应说明书。

**1.2.3  $\alpha$  淀粉酶基因在大肠杆菌中的表达** 分别接种重组菌株于 10 mL LB 培养基中,并添加卡那霉素至总质量浓度 20  $\mu$ g/mL。于 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后,按体积分数 1% 接种于 50 mL (250 mL 三角瓶)新鲜 LB 培养基中,同时添加同样质量浓度的抗生素。继续振荡培养至光密度(OD<sub>600</sub>)为 1.0 时加入 IPTG,至终浓度为 0.8 mmol/L 进行诱导,并将诱导温度控制在 30 °C。诱导 10 h 后在 5 000 r/min、4 °C 条件下离心 5 min,收集菌体。使用 10 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0)重悬细胞并置于冰上,经超声波破碎后对粗酶液进行淀粉酶活力检测和 SDS-PAGE 检测,或大量制备该细胞破碎液以进行淀粉酶纯化实验。

**1.2.4  $\alpha$  淀粉酶酶活力测定** 取 1 mL 可溶性淀粉(1 g/dL)与 0.25 mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0)混合,50 °C 温浴 5 min 后加入 0.1 mL  $\alpha$  淀粉酶液,继续保温 10 min 后立即加入 0.1 mL 盐酸溶液(0.1 mol/L)终止反应。使用 DNS 法<sup>[13]</sup>对反应液中的还原糖进行定量。以烘干至恒重的麦芽糖为标样绘制 DNS 标准曲线。一个  $\alpha$  淀粉酶酶活力单位(U)定义为:在上述反应条件下,每分钟生成 1 mg 麦芽糖所需的酶量。

**1.2.5  $\alpha$  淀粉酶的纯化** 重组体细胞破碎液经脱盐柱脱盐后进行冷冻干燥,使用适量体积的磷酸钠(20 mmol/L)-氯化钠(0.5 mol/L)-咪唑(25 mmol/L)缓冲液溶解,并经 Ni 亲和柱(HisTrap

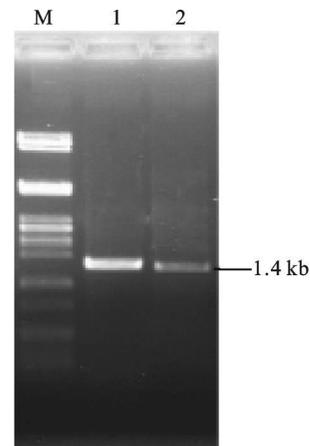
HP, GE Healthcare)进行纯化,纯化步骤及条件按相关说明书进行。

**1.2.6 淀粉酶作用淀粉终产物分析** 使用 pH 5.0 缓冲液配制浓度为 1 g/dL 马铃薯淀粉溶液,在 1 mL 淀粉溶液中加入 0.2 mL 淀粉酶液(10 U),并在 40 °C 下反应,取不同保温时间的样品使用 HPLC 方法进行产物分析。使用 Agilent 氨基柱(ZORBAX NH<sub>2</sub>, 4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m)检测,以 65% 乙腈为流动相,流速为 1 mL/min,柱温为室温。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ 淀粉酶基因的扩增及序列分析

分别以两株米根霉 CICIM F0071 和 CICIM F0072 染色体 DNA 为模板,通过 PCR 方法分别得到大小为 1 386 bp 的基因片段,见图 1,并分别命名为 *RoAmy1* 和 *RoAmy2*。将两条基因片段分别克隆入 T-载体 pMD19-simple,通过蓝板平板筛选重组菌,提取重组质粒并对目的基因进行测序。结果表明:两条基因的相似度为 95.54%,以 *RoAmy1* 为参照,*RoAmy2* 基因产生了 41 个碱基的替换,包括 4 个碱基颠换和 37 个碱基转换。*RoAmy1* 的 GenBank 检索号为:HM 234170。



Lane M: ( $\lambda$ DNA/*Pst*I; Lane 1: *RoAmy1*. Lane 2: *RoAmy2*.)

图 1 米根霉  $\alpha$  淀粉酶基因的扩增

Fig. 1 Amplification of the  $\alpha$  amylase gene from *R. oryzae*

通过软件 DNAMAN 6.0 预测该得到该两个淀粉酶基因的推衍蛋白质(462 个氨基酸)序列见图 2。两条蛋白质氨基酸序列的相似度为 97.84%,以 *RoAmy1* 为参照,*RoAmy2* 蛋白质产生了 10 个氨基酸残基的变化,分别发生在 Ser<sup>56</sup> → Asn, Val<sup>93</sup> → Ala, Ser<sup>103</sup> → Thr, Thr<sup>143</sup> → Ile, Arg<sup>163</sup> → Thr, Asp<sup>171</sup> → Ser, Asn<sup>173</sup> → Thr, Val<sup>221</sup> → Ile, Ile<sup>260</sup> →

Leu 和 Asn<sup>462</sup> → Lys, 其中, 5 个发生在淀粉酶的结构域 A 区, 4 个发生在结构域 B 区, 1 个发生在结构

域 C 区, 见图 3。表明氨基酸残基的变化并没有明显改变该蛋白质的三级结构。

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| RA1 | MKSFLLSLLC SVFL LPLVWQSVPV IKRAS ASDWENRVIY QLLTDRFAKSTDDTNGC <sub>5</sub> NLSD   | 60  |
| RA2 | MKSFLLSLLC SVFL LPLVWQSVPV IKRAS ASDWENRVIY QLLTDRFAKSTDDTNGC <sub>5</sub> NLSD   | 60  |
| RA1 | YCGGTFQGI INHLDYIAGMGFDA IWISPIPKNWNGGYHGYWASDFSQINEHFGTADD LKK   | 120 |
| RA2 | YCGGTFQGI INHLDYIAGMGFDA IWISPIPKN <sub>5</sub> NGGYHGYW <sub>5</sub> ASDFSQINEHFGTADD LKK                                      | 120 |
| RA1 | LVA <sub>5</sub> AHAKNMYVMLDVVANHAGT PSSGGDYSGYTFGQS SEYHRACDINYNQNSIEQCWI  | 180 |
| RA2 | LVA <sub>5</sub> AHAKNMYVMLDVVANHAG <sub>1</sub> PSSGGDYSGYTFGQS SEYH <sub>5</sub> ACDINYN <sub>5</sub> Q <sub>5</sub> ESIEQCWI | 180 |
| RA1 | SGLPDINTE <sub>5</sub> DAI VSKLNSIVSGWVSDY GFDGLRIDTVKHKVRKDFMDGYVSAAGVFATGE  | 240 |
| RA2 | SGLPDINTE <sub>5</sub> DAI VSKLNSIVSGWVSDY GFDGLRIDTVKHK <sub>1</sub> RKDFMDGYVSAAGVFATGE                                       | 240 |
| RA1 | VLSGDVSYVSPYQ QHVPS LINYP LYYPVYDVFTKSR <sub>5</sub> TMSRLSS GFS <sub>5</sub> DIKNGMFKNIDVLV                                    | 300 |
| RA2 | VLSGDVSYVSPYQ QHVPS L <sub>1</sub> INYP LYYPVYDVFTKSR <sub>5</sub> TMSRLSS GFS <sub>5</sub> DIKNGMFKNIDVLV                      | 300 |
| RA1 | NFIDNHDQPRLLSKADQS LVKNALAYSFMVQGI PVLYYGTEQS FKGNDPNMREVLWTTG  | 360 |
| RA2 | NFIDNHDQPRLLSKADQS LVKNALAYSFMVQGI PVLYYGTEQS FKGNDPNMREVLWTTG  | 360 |
| RA1 | YSTTSDMYK FVTTLVKARKGSNS TVNMG IAQTDNVYV <sub>5</sub> FQ <sub>5</sub> RGGSLVVVNNYGGQSTNTITV                                     | 420 |
| RA2 | YSTTSDMYK FVTTLVKARKGSNS TVNMG IAQTDNVYV <sub>5</sub> FQ <sub>5</sub> RGGSLVVVNNYGGQSTNTITV                                     | 420 |
| RA1 | KAGSFSNGD TLTDVFSNKSVTVQNNQIT FQLQNGNPAI FQKN   | 462 |
| RA2 | KAGSFSNGD TLTDVFSNKSVTVQNNQIT FQLQNGNPAI FQ <sub>5</sub> K  | 462 |

图 2 两种  $\alpha$ -淀粉酶预测氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of amino acid sequences of RoAmy1 (RA1) and RoAmy2 (RA2) from *R. oryzae*

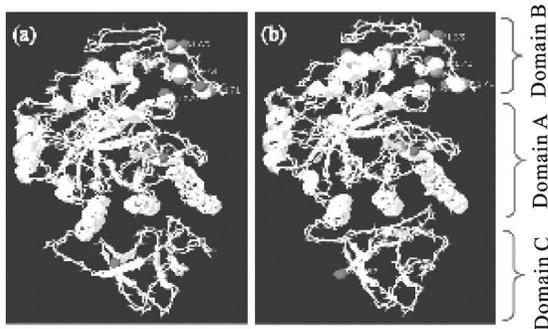


图 3 RoAmy1 和 RoAmy2 三级结构图

Fig. 3 Ribbon diagram of RoAmy1 (a) and RoAmy2 (b) produced by Swiss-PdbViewer 4.0.1 based on TAA<sup>[6]</sup>

NCBI 比对分析, 发现该蛋白质与 124 个已报道的真菌淀粉酶蛋白结构相似, 并将该蛋白归类为糖苷水解酶家族 13, 在氨基端 (N-terminal) 含有一个淀粉酶家族所具有的典型的 8 个  $\alpha$  螺旋和 8 个  $\alpha$  折叠交替组成的  $\alpha/\beta$  桶状结构 (Pfam00128), 在羧基端 (C-terminal) 含有一个功能未知的可变区域 (Pfam09260), 这部分区域存在于多种真菌  $\alpha$  淀粉酶中, 见图 4。



图 4 RoAmy 结构分析

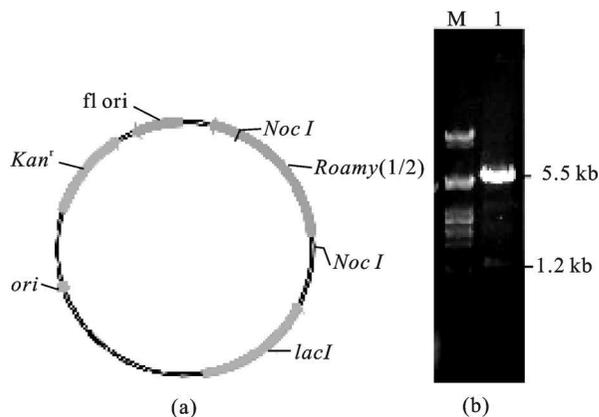
Fig. 4 Analysis of the domain architecture of RoAmy

### 2.2 $\alpha$ -淀粉酶结构分析

由于两个蛋白质的氨基酸序列非常相似, 因而只选择其中一条序列 (RoAmy1) 进行分析。通过比对发现该蛋白质具有淀粉酶家族所特有的 4 个保守区域, 分别为 Region I (Asp<sup>135</sup>-His<sup>140</sup>), Region II (Asp<sup>211</sup>-His<sup>220</sup>), Region III (Gly<sup>239</sup>-Ser<sup>243</sup>) 和 Region IV (Phe<sup>302</sup>-Asp<sup>307</sup>)。据文献[14-16]报道, Region I 内的保守氨基酸残基 Asp<sup>135</sup>, Asn<sup>139</sup> 和 His<sup>140</sup> 以及分别位于 Region II, Region III 和 Region IV 内的关键氨基酸残基 Asp<sup>216</sup>, Glu<sup>240</sup> 和 Asp<sup>307</sup> 对淀粉酶保持催化活性具有重要作用。结合图 2 可知, RoAmy1 与 RoAmy2 之间的氨基酸残基在 4 个淀粉酶的保守区域内均没有差异。通过

### 2.3 $\alpha$ -淀粉酶基因的扩增及表达载体的构建

使用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切 pMD19-RoAmy1, 胶回收目的片段并连接入 pET-28a (+) 质粒的 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切位点, 转化 *E. coli* JM109 并通过提取质粒验证得到重组质粒 pET-RoAmy1, 其图谱见图 5 (a)。使用 *Nco*I 酶切重组质粒, 大小应为 5.5 kb 和 1.2 kb 见图 5 (b), 表明目的基因已正确插入表达质粒。提取质粒 pET-RoAmy1 并转化 *E. coli* BL21 (DE3) 或 *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus, 得到相应的重组大肠杆菌。使用同样的方式构建重组质粒 pET-RoAmy2 并构建相应的重组大肠杆菌。



(a) Map of pET-RoAmy; (b) Verify the recombinant plasmid pET-RoAmy. Lane M: ( $\lambda$ DNA/PstI; Lane 1: pET-RoAmy/NcoI

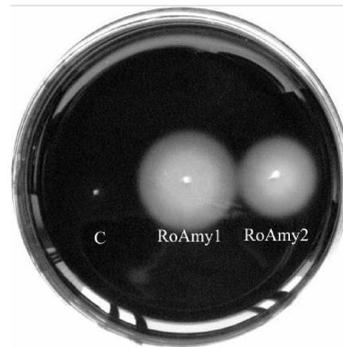
图5 重组质粒 pET-RoAmy(1/2)的构建

Fig. 5 Construction of plasmid pET-RoAmy

## 2.4 $\alpha$ 淀粉酶基因在大肠杆菌中表达

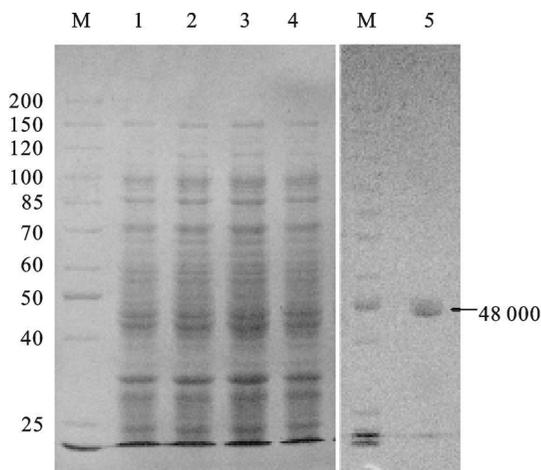
将重组质粒 pET28-RoAmy(1/2) 及原始质粒 pET28a(+) 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 和 *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus 菌株, 获得相应的重组菌株。使用 IPTG 对重组大肠杆菌及对照菌株 *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus (pET-28a(+)) 进行诱导表达。重组体细胞经超声波破碎后, 分别对破碎液进行  $\alpha$ 淀粉酶活力检测和蛋白质表达量 (SDS-PAGE) 检测。将3种重组体细胞破碎液点入含0.5 g/dL 可溶性淀粉的LB固体平板, 40  $^{\circ}$ C保温10 min后, 使用稀碘液染色并观察透明圈形成情况, 结果见图6。对 *E. coli* 重组体 pET-RoAmy1 和 pET-RoAmy2 的细胞破碎液, 在平板中出现明显的透明圈, 表明破碎液中具有  $\alpha$ 淀粉酶活力, 而对照菌株则不具有淀粉酶活力。经酶活力测定可知 RoAmy1 及 RoAmy2 在 *E. coli* BL21 中的表达量分别为 0.7 U/mL 和 0.2 U/mL, 在 *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus 中的表达量分别为 1.3 U/mL 和 0.5 U/mL。

*E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus 原始菌株及相应重组体细胞破碎液在 SDS-PAGE 中没有表现出明显的蛋白质表达差异, 结果见图7。两个淀粉酶基因虽然在 *E. coli* 中得到表达, 但由于蛋白质表达量过低, 两者在 SDS-PAGE 中均没有表现出明显的蛋白质条带。细胞破碎液经纯化、浓缩后可在 SDS-PAGE 上表现出电泳纯单一条带, 大小约为 48 000, 见图7, 与预测的相对分子质量(48 700) 非常接近。



RoAmy1: pET-RoAmy1; RoAmy2: pET-RoAmy2; C: pET-28a(+)

图6 淀粉平板检测大肠杆菌重组体破碎液淀粉酶活力  
Fig. 6 Detect the  $\alpha$ -amylase activity of cellular fragment of *E. coli* recombinants on starch contained LB plate



M: molecular mass marker; 1: host control; 2: pET-28a(+); 3: pET-RoAmy1; 4: pET-RoAmy2; 5: purified RoAmy1

图7 大肠杆菌重组体破碎液 SDS-PAGE 检测

Fig. 7 SDS-PAGE of cellular fragment of *E. coli* BL21 (DE3) CodonPlus recombinants

## 2.5 RoAmy1 与商品真菌 $\alpha$ 淀粉酶性能的比较

将纯化后的 RoAmy1 酶液与商品酶稀释至同一酶浓度, 对马铃薯淀粉进行作用, 作用产物使用 HPLC 方法进行检测, 结果见表2。结果表明, 在 RoAmy1 酶液水解该淀粉的过程中, 反应初期(2 h) 产物中有一定量的麦芽三糖和麦芽四糖残留, 随着作用时间的延长(12 h), 终产物中麦芽三糖和麦芽四糖的量逐渐减少, 甚至完全消失。其中酶作用底物 12 h 后, 反应液中葡萄糖含量为 10% 左右, 麦芽糖含量高达 74%, 其它寡糖的含量几乎检测不到; 在使用商品酶水解该淀粉的过程中, 随着水解时间的延长, 终产物中葡萄糖含量急剧上升, 麦芽糖含量大幅下降, 同时终产物中麦芽三糖和麦芽四糖的

含量有微弱的增加趋势。RoAmy1 水解产物中具 有麦芽糖含量高,葡萄糖含量低等特点。

表2 RoAmy1和商品真菌 $\alpha$ -淀粉酶作用马铃薯淀粉终产物分析

Tab.2 Analysis of end-products formed by RoAmy1 and commercial fungal  $\alpha$ -amylase on potato starch

| $\alpha$ -淀粉酶      | 终产物质量分数/% <sup>a</sup> |      |     |     |      |      |                 |     |
|--------------------|------------------------|------|-----|-----|------|------|-----------------|-----|
|                    | 2 h <sup>b</sup>       |      |     |     | 12 h |      |                 |     |
|                    | G1 <sup>c</sup>        | G2   | G3  | G4  | G1   | G2   | G3              | G4  |
| RoAmy1             | 10±2                   | 60±3 | 5±1 | 1±1 | 14±3 | 74±2 | ND <sup>d</sup> | ND  |
| 商品真菌 $\alpha$ -淀粉酶 | 18±1                   | 48±3 | 6±1 | ND  | 46±3 | 21±2 | 9±1             | 2±1 |

a: 终产物质量分数% = (终产物质量浓度/初始淀粉质量浓度) × 100%。b: 2 h 和 12 h 表示淀粉酶水解淀粉时间。c: G1、G2、G3 和 G4 分别表示葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖和麦芽四糖。d: ND 表示没有检测到或含量很低超出 HPLC 检测范围。

### 3 结 语

作者根据博德研究所公布的米根霉基因组信息,分别从两株米根霉中克隆了两条 $\alpha$ 淀粉酶基因,对淀粉酶基因进行序列和结构分析并在大肠杆菌中进行功能性验证。通过功能验证以及淀粉酶保守序列分析,确定该淀粉酶基因内部不含内含子。该淀粉酶具有淀粉酶家族所具有的4个典型的淀粉酶高度保守区域,属于淀粉酶家族13成员。同源性比对分析表明,该淀粉酶与已报道的淀粉酶具有很大差异,如与该淀粉酶相似度最高的为来源于绿色木霉(*Trichoderma viride*)的 $\alpha$ 淀粉酶(42.8%)。与目前应用最为广泛的来源于米曲霉(*Aspergillus oryzae*)的商品真菌 $\alpha$ 淀粉酶相似度仅为36.4%。由于两条淀粉酶氨基酸序列非常相似,因此实验中仅对一个表达量较高的淀粉酶(RoAmy1)进行了纯化和淀粉水解实验。纯化后RoAmy1蛋白质相对分子质量与预测的该淀粉酶蛋白质相对分子质量非常接近,约为48 000。淀粉水解实验表明,与商品真菌 $\alpha$ 淀粉酶相比,RoAmy1具有麦芽糖形成率高、葡萄糖含量或其它低聚糖含量低等特点。该商品真菌 $\alpha$ 淀粉酶的生产菌株为曲霉属微生物,而曲霉属微生物通常具有丰富的淀粉水解酶系<sup>[4]</sup>,因此在商品酶中必然也会有其它淀粉水解类的存在,从而降低真菌 $\alpha$ 淀粉酶的水解性能,导致产物中大量麦芽糖向葡萄糖转变。然而,即使是纯的商品真菌 $\alpha$ 淀粉酶,如米曲霉所产 $\alpha$ 淀粉酶,其水解淀粉终产物中麦芽糖含量的极限值仅为60%左右<sup>[17]</sup>。本研究中获得的真菌 $\alpha$ 淀粉水解淀粉终产物中麦芽糖质量分数高达74%,表明来源于米根霉的真菌 $\alpha$ 淀粉酶在以淀粉质为原料生产高麦芽糖行业比本研究中所测定的来源于曲霉属微生物的真菌 $\alpha$ 淀粉酶具有更大的优势,因此可能具有一定潜在的研究或应用价值。

研究中利用IPTG诱导成功实现了RoAmy在

*E. coli* DE3系列菌株中的功能性表达,并利用Ni亲和柱快速实现了该淀粉酶的分离和纯化。RoAmy1和RoAmy2在*E. coli* BL21(DE3)的表达量分别为0.7 U/mL和0.2 U/mL。结果表明:虽然两个不同淀粉酶基因是在同样的表达元件和发酵方式下进行表达,但两者在相同菌株中的表达量差异仍然较大。通过序列比对发现,研究中获得的两条淀粉酶基因相似度较高,其基因序列的相似度为95.54%,其推衍氨基酸序列相似度为97.84%。虽然两条淀粉酶基因在功能区域内有41个碱基不同,但是推衍蛋白质序列仅有10个氨基酸残基的差异(主要集中在结构域A(5个)和结构域B(4个)内,而在该淀粉酶的保守区内没有发生变化),表明两个淀粉酶具有高度相似性的同时其密码子使用频率之间的差异较为明显。由于两个淀粉酶在生物预测的性质功能或三级结构等方面高度相似,所以两者在同样方式下进行异源表达时,其表达量应与各基因自身信息具有较大关联,由此推断两者之间密码子使用频率的差异可能是造成两者在*E. coli*中的表达量具有明显差异的一个主要因素。

外源基因在*E. coli*中表达时,由于密码子使用偏好性的不同,尤其是一些稀有密码子,如精氨酸(Arg)、脯氨酸(Pro)、亮氨酸(Leu)和异亮氨酸(Ile)等对异源蛋白质的合成和过量表达影响较大<sup>[18]</sup>,可能对RoAmy在*E. coli* BL21(DE3)中过量表达也具有限制作用,所以实验中尝试了使用稀有密码子优化菌株*E. coli* BL21(DE3) CodonPlus表达RoAmy,虽然两种淀粉酶的表达量分别得到了一定的提高,但表达量却依然很低(最高约为1.3 U/mL),表明RoAmy中存在的稀有密码子可能是该淀粉酶不能在*E. coli*中获得过量表达的限制因素之一,但并不是主要因素,而如RoAmy的SD序列、mRNA的二级结构、mRNA在*E. coli*中的稳定性及蛋白质的后加工等限制因素可能对其在*E. coli*中的过量表达有重要影响<sup>[19-20]</sup>。

综上所述,作者获得了两条米根霉 $\alpha$ 淀粉酶编

码基因并在大肠杆菌中得到的功能性表达, 淀粉水解实验表明, 该淀粉酶比市售的商品真菌  $\alpha$  淀粉酶具有更高的麦芽糖形成能力, 使得该酶在高麦芽糖行业可能具有一定的应用潜力和优势。然而, 该酶

在大肠杆菌中的表达量非常低, 这为后期的酶学性质研究及其它应用带来了极大困难, 因此如何提高该淀粉酶的异源表达量将是后期研究的重点。

## 参考文献(References):

- [ 1 ] Gupta R, Paresh G, Harapriya M, et al. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective[J]. **Process Biochem**, 2003, 38 (11): 1599– 1616.
- [ 2 ] Sivaramkrishnan S, Gangadharan D, Kesa van M N, et al.  $\alpha$  Amylases from microbial sources—an overview on recent developments[J]. **Food Technol Biotechnol**, 2006, 44 (2): 173– 184.
- [ 3 ] 孙海彦, 张伟国. *Penicillium sp.* X-1 液态发酵生产淀粉酶的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26 (3): 106– 109.  
SUN Hai-yan, ZHANG Wei-guo. Optimization of the production of raw starch digesting enzyme by *Penicillium sp.* X-1 under submerged culture[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26 (3): 106– 109. (in Chinese)
- [ 4 ] YUAN X-L, Van der kaaij R M, Van den hondel C A M J J, et al. *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles[J]. **Mol Genet Genomics**, 2008, 279 (17): 545– 561.
- [ 5 ] Kornan D R, Bayliss F T, Barnett C C, et al. Cloning, characterization, and expression of two alpha-amylase genes from *Aspergillus niger var. awamori* [J]. **Curr Genet**, 1990, 17 (3): 203– 212.
- [ 6 ] Toda H, Kondo K, Narita K. The complete amino acid sequence of Tak $\alpha$ -amylase A [J]. **Proc Jpn Acad**, 1982, 58 (7): 208– 212.
- [ 7 ] Simone C P, Joao A J, Hector F T, et al. *Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis*: a thermotolerant fungus with potential for production of thermostable amylases [J]. **Int Microbiol**, 2003, 6 (4): 269– 273.
- [ 8 ] Soccol C R, Iloki I, Marins B, et al. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus strains* in submerged and solid state fermentations[J]. **J Food Sci Technol**, 1994, 31 (4): 320– 323.
- [ 9 ] LI Y-N, SHI G-Y, WANG W, et al. A newly isolated *Rhizopus microsporus var. chinensis* capable of secreting amylolytic enzymes with raw-starch-digesting activity[J]. **J Microbiol Biotechnol**, 2010, 20 (2): 383– 390.
- [ 10 ] Mertens J A, Skory C D. Isolation and characterization of a second glucoamylase gene without a starch binding domain from *Rhizopus oryzae* [J]. **Enzyme Microb Tech**, 2007, 40 (4): 874– 880.
- [ 11 ] Chou W I, Pai T W, Liu S H, et al. The family 21 carbohydrate binding module of glucoamylase from *Rhizopus oryzae* consists of two sites playing distinct roles in ligand binding[J]. **Biochem J**, 2006, 396 (3): 469– 477.
- [ 12 ] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF. 分子克隆实验指南(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1986.
- [ 13 ] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. **Anal Chem**, 1959, 31 (3): 426– 429.
- [ 14 ] Yoshiki M. A possible mechanism of catalysis involving three essential residues in the enzymes of  $\alpha$ -amylase family[J]. **Biologia Bratislava**, 2002, 11: 21– 27.
- [ 15 ] Takashi K, Tadayuki I. The concept of the  $\alpha$ -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism[J]. **J Biosci Bioeng**, 1999, 87 (5): 557– 565.
- [ 16 ] Park K H, Kim T J, Cheong T K, et al. Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the  $\alpha$ -amylase family[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2000, 1478 (2): 165– 185.
- [ 17 ] Doyle E M, Noone A M, Kelly C T, et al. Comparison of the action pattern of two high maltose-forming  $\alpha$ -amylases on linear maltooligosaccharides[J]. **Enzyme and Microb Tech**, 1999, 25 (3): 330– 335.
- [ 18 ] Anderas G, Karsten H, Maurice S, et al. JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host[J]. **Nucleic Acids Res**, 2005, 33: W526– W531.
- [ 19 ] 隋广超, 胡美浩. 影响大肠杆菌中外源基因表达的因素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (2): 128– 132.  
SHUI Guang-chao, HU Mei-hao. Effect factors of foreign gene expression in *Eschenchia coli* [J]. **Pro Biochem Biophys**, 1994, 21 (2): 128– 132. (in Chinese)
- [ 20 ] Clive R W, Michael A B, Thankor P P, et al. The influence of messenger RNA secondary structure on expression of an immunoglobulin heavy chain in *Eschenchia coli* [J]. **Nucleic Acids Res**, 1984, 12 (9): 3937– 3950.