

一种中性普鲁兰酶及其在红薯粉丝制作中的应用

朱新文¹, 德青美朵¹, 王 婕¹, 邵罗楠¹, 姚 雁²,
沈 微^{*1,3}, 杨海泉¹, 陈猷忠¹, 樊 游³

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡先秦生物科技有限公司, 江苏 无锡 214073; 3. 江南大学 中国高校工业微生物资源数据平台, 江苏 无锡 214122)

摘要: 本研究旨在开发一种在较宽泛的 pH 范围内活性稳定的中性普鲁兰酶, 以适应以红薯面为原料的粉丝制作工艺。以地表地芽孢杆菌(*Geobacillus subterraneus*) XQ3665 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增得到普鲁兰酶基因 *pul3665*, 并实现了异源表达。重组酶 PUL3665 纯酶比酶活为 32 U/mg, 最适反应温度 55 °C, 最适 pH 为 6.5, 在 pH 5.5~7.5 范围内酶活保持在最高酶活的 80% 以上。PUL3665 降解普鲁兰多糖的产物为麦芽三糖, 不降解可溶性直链淀粉, 是一种 I 型普鲁兰酶。在以不同 pH 值的红薯面为原料的粉丝制作工艺中, 按每克芡糊淀粉 2 U 的量添加枯草芽孢杆菌表达的 PUL3665 粗酶液处理芡糊, 均能在不添加明矾或其它添加剂的条件下制作出粉丝, 且成品粉丝质量与添加明矾获得的粉丝基本一致。PUL3665 有望开发成一种用量小, 使用效果稳定的新型明矾替代物。

关键词: 地表地芽孢杆菌; 普鲁兰酶; 异源表达; 红薯粉丝; 明矾替代物

中图分类号: S 816.53 文章编号: 1673-1689(2020)08-0059-11 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.08.008

Characterization of a Neutrophil Pullulanase and Its Application in Sweet Potato Vermicelli Processing

ZHU Xinwen¹, Deqingmeiduo¹, WANG Jie¹, SHAO Luonan¹, YAO Yan²,
SHEN Wei^{*1,3}, YANG Haiquan¹, CHEN Xianzhong¹, FAN You³

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Wuxi Xianqin Biotechnology Co. Ltd., Wuxi 214037, China; 3. Culture and Information Center of Industrial Microorganism of China Universities, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This research aimed to develop a neutral pullulanase with stable activity in a wide pH range, which can adapt to the manufacturing process of vermicelli with sweet potato powder as raw material. The pullulanase-encoding gene *pul3665* was cloned from genome DNA of *Geobacillus subterraneus* XQ3665 by PCR and heterologously expressed. Specific activity of the purified recombinant enzyme PUL3665 is 32 U/mg. The optimal temperature and pH of PUL3665 were 55 °C and 6.5, respectively. The PUL3665 maintain 80% of its highest activity in the range of pH 5.5~7.7. The product of enzymatic degradation of pullulan was maltotriose, and the PUL3665 did

收稿日期: 2019-02-01

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102101-5)。

* 通信作者: 沈 微(1968—), 男, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品酶学方面的研究。E-mail: 13921108341@163.com

not degrade amylose. Thus, the PUL3665 belongs to type I pullulanases. The crude enzyme of PUL3665 expressed by *B. subtilis* was used in the traditional vermicelli-making process. The paste was treated with PUL3665 at a dose of 2 U/g of paste. Vermicellis were successfully achieved using different kinds of sweet potato powder as raw materials. Neither alum nor other additives were used. The quality of the finished vermicelli made from PUL3665 treated paste was about the same to that of the vermicelli which was made with alum as additives. The PUL3665 is expected to be developed into a highly effective and reliable substitute of alum in vermicelli production.

Keywords: *Geobacillus subterraneus*, pullulanase, heterologous expression, sweet potato vermicelli, substitute of alum

粉丝是我国特有的传统美食,已有上千年的历史^[1-2]。根据原料的不同,粉丝可以分为不同的种类,其中市场上最常见的是绿豆粉丝和薯类粉丝。不同种类的淀粉对粉丝品质的影响很大^[3],以绿豆淀粉为原料制作的粉丝质量普遍优于薯类淀粉粉丝。金茂国等研究发现,绿豆淀粉含有较高比例的直链淀粉,尤其是其中较多的不溶性直链淀粉是绿豆粉丝质量高的关键原因^[3]。薯类淀粉的原料来源丰富,价格低廉,但薯类淀粉粉丝质量明显不如绿豆淀粉。按传统工艺生产薯类粉丝时一般需要添加明矾以防止粉丝间互相粘连、提高产品的耐煮性并降低断条率。由于长期摄入明矾可能对人体健康带来危害,为此科研工作者研究了黄原胶、复合磷酸盐、CMC 纤维素、海藻酸钠等多种明矾替代物^[4-8],这些明矾替代物在一定程度上解决了由明矾带来的食品安全问题,但其用量较大,一般要达到粉丝淀粉总量的 0.3%以上,这增加了粉丝的生产成本也可能带来新的食品安全隐患。普鲁兰酶专一性水解淀粉中的 α -1,6-糖苷键,可以将支链淀粉水解为直链淀粉。理论上讲,用普鲁兰酶处理淀粉可以提高其直链淀粉的含量,但这种方法在实际应用时存在两方面的困难。一是淀粉分子在低温下一般以结晶的颗粒状存在,在淀粉的水悬液中大部分分子接触不到酶,淀粉的酶解难以实现。二是淀粉水悬液在高温糊化时形成很高的粘度,而高浓度的水悬液几乎可以变成固体状,酶解同样无法实现。刘程玲等^[9]用普鲁兰酶直接水解淀粉水悬液,使红薯淀粉中直链淀粉的含量提高了 8.57%。这种方法的缺点是普鲁兰酶与淀粉水悬液需要在 55 °C 下摇瓶反应 15 h,生产时需要专门的设备并且动力消耗较大。本课题组在前期研究中建立了一种以普鲁兰酶水解芡糊

的酶法粉丝制作方法^[10],反应时间只有 30 min,在完全不添加明矾及其它添加剂的情况下,制作出的成品粉丝在断条率等质量指标上与添加明矾制得的粉丝基本一致。针对这一工艺,本课题组还开发了一种来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的普鲁兰酶 GsP^[11],研究表明,这种中性耐热型普鲁兰酶在粉丝制作中的使用量明显小于目前商品化的耐酸性普鲁兰酶^[12]。酶本身是一种蛋白质,加热变性后与其他蛋白质并没有本质的差异,其水解产生的直链淀粉也是淀粉的正常成分,因此从食品安全考虑,用普鲁兰酶水解芡糊是一种比较理想的无明矾粉丝制作方法。本课题组在江苏省东海农村进行酶法粉丝技术应用试验中发现,以 GsP 或商品化普鲁兰酶水解芡糊制作粉丝的方法在应用于纯淀粉为原料的工艺中时均能获得稳定的结果,但以未经提纯的淀粉质原料制作粉丝时则结果很不稳定,重要原因之一是以这些材料制作的芡糊的 pH 有比较大的波动,导致普鲁兰酶的作用效果不稳定。对此,本课题组对前期收藏的地芽孢杆菌属的菌株进行筛选,获得了一株编号为 XQ3665 的地表地芽孢杆菌 (*Geobacillus subterraneus*),这株菌所产普鲁兰酶具有较为宽泛的 pH 适应范围,有可能在一定程度上解决以非纯淀粉原料制作粉丝时遇到的问题。作者研究了这种普鲁兰酶在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌中的表达以及重组酶在以红薯面为原料的粉丝制作中的应用效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 地表地芽孢杆菌 XQ3665 菌株:从无锡先秦生物科技有限公司菌种库中筛选得

到,已进一步在江南大学中国高校工业微生物资源数据平台进行正式保藏,保藏编号为 CICIM B6904;大肠杆菌表达载体 pLac03:由作者所在课题组保藏^[11];枯草芽孢杆菌表达载体 pUP43:由无锡先秦生物科技有限公司提供,是一种以 P43 启动子控制外源基因表达的大肠杆菌-芽孢杆菌穿梭型表达载体,其在芽孢杆菌中的复制原点和卡那霉素抗性基因均来源于质粒 pUB110,该质粒已保藏在江南大学中国高校工业微生物资源数据平台,保藏编号为 CICIMB6941。

1.1.2 工具酶及主要试剂 聚合酶 ExTaq 以及限制性内切酶 *EcoRI*、*XbaI* 等:大连宝生物工程有限公司产品;质粒提取试剂盒:北京博大泰克生物技术有限公司产品;PCR 产物纯化试剂盒及 DNA 片段胶回收试剂盒:康宁生命科学(吴江)有限公司产品;普鲁兰糖:Sigma 公司产品;蛋白质标准相对分子质量:赛默飞世尔(中国)有限公司产品;预染蛋白质相对分子质量标准 PageRulerTM 26616、氨苄青霉素钠、卡那霉素、IPTG、SDS-PAGE 电泳预制胶:上海生工生物工程技术服务有限公司产品;其它试剂:国药集团上海化学试剂有限公司产品;红薯粉(红薯面):本课题组在江苏省东海县农村收购。

1.1.3 引物合成及测序 根据地表面芽孢杆菌 KCTC3922 的基因组序列(NCBI 登录号:CP014342.1)设计扩增普鲁兰酶基因的引物:

Pxw01:5' -AATTACCGGAATTCCTTATGCTTCACATTCACCGAAC-3'

Pxw02:5' -AATTACCGTCTAGATTAGCGGGCATTGATCGCTT C-3'

Pxw03:5' -AATTACCGACTAGT[AGGAGG]AATCTTATGCTTCACATTCACCGAAC-3'

Pxw04:5' -AATTACCGGGATCCTTAGCGGGCATTGATCGCTT C-3'

引物中带下划线部分为内切酶识别位点,带方框部分为引物自带的核糖体结合位点序列。

引物由上海赛百盛基因技术服务有限公司合成,测序由苏州泓迅生物科技有限公司完成。

1.1.4 培养基 LB 培养基:10 g/L 蛋白胨,10 g/L NaCl,5 g/L 酵母粉,加入 1.5%的琼脂粉为固体培养基,使用时均补加氨苄青霉素至终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。发酵培养基为 TB 培养基,北京吉美生

物科技有限公司产品,用于大肠杆菌发酵时补加终质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氨苄青霉素和终质量浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,用于枯草芽孢杆菌发酵时添加 15 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒 pLac03-pul3665 的构建 提取地表地芽孢杆菌 XQ3665 的基因组 DNA,以 Pxw01、Pxw02 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物电泳分离后回收,与 pMD-18TSimple 连接过夜,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上挑取转化子,提取质粒酶切验证后测序。选取重组质粒用 *EcoRI*、*XbaI* 酶切,分离其中的插入片段与经同样酶切的表达载体 pLac03 连接,转化 JM109 感受态细胞,挑取转化子并提取质粒进行酶切验证,验证正确的重组质粒命名为 pLac03-pul3665。

1.2.2 重组质粒 pUP43-pul3665 与重组枯草芽孢杆菌的构建 以重组质粒 pLac03-pul3665 为模板,以 Pxw03、Pxw04 为引物进行 PCR 扩增,扩增产物经电泳分离并回收后用 *SpeI* 和 *BamHI* 酶切,并与经同样酶切的载体 pUP43 连接,连接物转化 JM109 感受态细胞,在含氨苄青霉素的平板上挑选转化子,提取质粒后酶切鉴定,验证正确的重组质粒命名为 pUP43-pul3665。

采用 Spizizen 法^[13]将质粒 pUP43-pul3665 和空质粒 pUP43 分别转化枯草芽孢杆菌 1A717。在含有 15 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 平板上检出转化子。挑取转化子划线分离后提取质粒。由于芽孢杆菌中提取的质粒电泳条带模糊,所以将从重组芽孢杆菌中提取的质粒再次转化大肠杆菌 JM109,在含氨苄青霉素的 LB 平板上检出转化子,挑取转化子后再从大肠杆菌中提取质粒酶切鉴定。从芽孢杆菌中提取质粒的方法同文献[14]。

1.2.3 重组普鲁兰酶的诱导表达 重组大肠杆菌诱导表达方法如下:取重组菌株于 LB 平板划线,取单菌落于 20 mL LB 液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 10 h。按照 1%的接种体积分数接种 50 mL TB 培养基,摇瓶培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时加入 IPTG 诱导表达,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 48 h。取培养液于 8 000 r/min 离心 10 min,按文献[9]方法,收集细胞内、周质空间和胞外成分检测酶活。

重组枯草芽孢杆菌诱导方法如下:接种重组单菌落于 20 mL LB 液体培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min

摇瓶培养 12 h。按 2% 接种体积分数接种 TB 液体培养基, 30 ℃、200 r/min 摇瓶培养, 每隔 8 小时取样, 取部分样品检测 OD₆₀₀。其余样品 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液直接检测酶活。沉淀细胞用磷酸盐缓冲液悬浮后超声波破细胞检测胞内酶活, 芽孢杆菌发酵试验均做 3 个平行样。

1.2.4 重组普鲁兰酶的纯化及酶活测定 取胞外粗酶液 5 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后用 Hitrap Desalting 柱脱盐, 缓冲液为 pH 7.0、0.02 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 收集脱盐后的酶液。

用 HiTrap QFF 阴离子交换柱进行第一次纯化, 平衡及上样缓冲液为 pH 7.0、0.02 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 用含 1 mol/L NaCl 的 pH 7.0、0.02 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 收集酶液检测酶活力。

用 HiTrap Butyl HP 疏水柱对上一步纯化得到的酶液进行疏水柱层析。用 pH 7.0、0.02 mol/L 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液进行线性梯度洗脱, 收集酶液检测酶活并用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白质纯度。

考马斯亮蓝法测定纯酶的蛋白质含量, 用于计算酶的比活力。普鲁兰酶酶活测定方法同文献[15]。

1.2.5 重组普鲁兰酶学性质的研究 最适温度的测定: 将酶液置于 40~70 ℃ 反应, 测定不同温度对酶活性的影响。以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活性。

最适 pH 的测定: 配制 pH 为 5~8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 测定不同 pH 对酶活性的影响。以最高酶活力为 100%, 计算相对酶活性。

重组酶温度耐受性的测定: 将纯酶分别放置于 50、55、60 ℃ 金属浴, 间隔 1 h 取样。以未进行热处理酶液的酶活为 100%, 计算相对酶活性。

酶学性质分析均做 3 个平行样。

1.2.6 重组普鲁兰酶对普鲁兰糖的降解 配制 10 g/L 的葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖标准样及普鲁兰糖, 取 10 g/L 的普鲁兰多糖溶液与过量普鲁兰酶反应, 将完全降解产物及标准样品用 0.22 μm 的滤膜过滤处理, 进行 HPLC 检测。色谱条件: Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 mm×7.8 mm), 流动相为 5 mmol/L 的 H₂SO₄, 超声波脱气, 流量为 0.5 mL/min, 柱温 65 ℃。检测器为 HITA-CHI 高效液相色谱仪示差折光检测器。

1.2.7 红薯粉丝传统制作方法

1) 制芡糊 取红薯粉 100 g, 用 100 mL 温水悬浮, 在 55 ℃ 水浴锅中保温 5 min, 一次性冲入 700 mL 沸水, 并剧烈搅拌制成芡糊。

2) 和面 芡糊中加入 4 g 食盐及 900 g 红薯粉手工和面, 揉成面团后用保鲜膜覆盖, 在 20 ℃ 恒温箱中放置 30 min。

3) 制丝、煮丝 取一普通水锅加入约 5 L 以上的自来水, 将水煮沸。将面团放入粉丝机中压制成丝, 压出的丝直接进入沸水中, 一般煮制 1~2 min 后捞出, 转移到一盛有凉水的锅中冷却。

4) 理丝、晾干: 将冷却的粉丝捞出后挂在竹竿上, 手工将并条的粉丝分开, 在阴凉通风处晾干即为成品粉丝。

明矾粉丝制作时是在制芡糊阶段在红薯粉悬液制成后加入相当于粉丝中淀粉总质量 0.1% 的明矾, 待明矾充分溶解后进入后续阶段。酶法粉丝制作是在芡糊制成后加入一定量的酶液, 混合后在 55 ℃ 保温 30 min。粉丝制作时所述普鲁兰酶酶活均为 55 ℃、pH 6.5 条件下检测的酶活。粉丝机为永康市博宁工贸有限公司产品, 型号为 HN-2006。

1.2.8 粉丝断条率计算 准确截取 10 cm 长, 无损伤的成品粉丝 100 根, 平均放在 5 个盛有 500 mL 去离子水的沸水杯中, 微沸腾煮沸 20 min。

断条率(%)=

$$\frac{\text{煮前粉丝条数}-\text{煮后仍保持完整的粉丝条数}}{\text{煮前粉丝条数}} \times 100\%$$

1.2.9 膨润度和煮沸损失率计算 取无损伤的粉丝若干, 截成 5 cm 长, 在 65 ℃ 烘箱中烘干至恒质量, 称取 5~6 g (m_1), 投入一装有 300 mL 已煮沸的去离子水烧杯中, 持续微沸腾煮沸 20 min, 过程中不断加水以保持水量基本恒定。完成后将烧杯放入冰水混合物中迅速冷却, 冷却至约 30 ℃ 时取出粉丝, 用新华滤纸吸干表面水分, 称湿质量(m_2)。将上述粉丝放入 65 ℃ 烘箱中烘至恒质量(m_3)。

$$\text{膨润度}(\%) = m_2/m_3 \times 100\%$$

$$\text{煮沸损失率}(\%) = (m_1 - m_3)/m_1 \times 100\%$$

膨润度、煮沸损失率和断条率试验均做两个平行样。

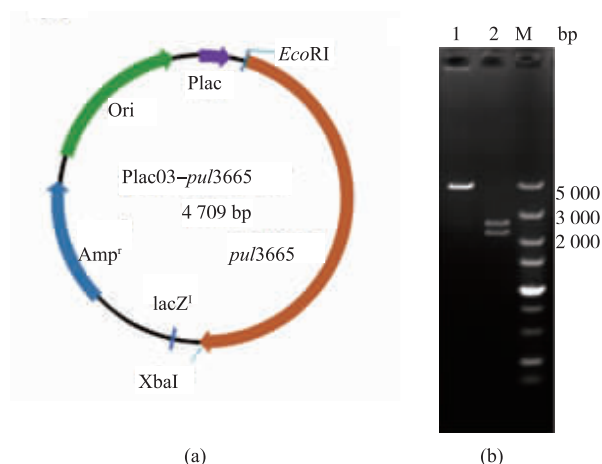
2 结果与分析

2.1 普鲁兰酶基因 *pul3665* 在大肠杆菌中的表达

提取地表地芽孢杆菌 XQ3665 的基因组 DNA

作为模板,用引物 P_{xw01}、P_{xw02} 进行 PCR 扩增,电泳结果显示目的条带大小约为 2.2 kb,与基因组序列(NCBI 登录号:CP014342.1)中预测的普鲁兰酶基因大小一致。PCR 产物纯化后与 pMD-18T Simple 连接,连接物转化大肠杆菌 JM109,任选 4 个转化子提取质粒后测序,结果显示,4 个转化子质粒中插入片段的序列完全一致。将上述测序结果提交 NCBI 用 Blast 软件进行序列搜索比对,结果显示,该插入片段的序列与地衣芽孢杆菌 KCTC3922 基因组序列(NCBI 登录号:CP014342.1)中一段推测为普鲁兰酶的基因的同源性最高为 99%,所克隆基因命名为 *pul3665* 用于进一步研究。

上述载体分别用 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切后分离其中 2.2 kb 的插入片段,与经同样酶切的表达载体 pLac03 连接,连接物转化大肠杆菌 JM109,任取 4 个转化子提取质粒后用 *EcoRI* 和 *XbaI* 酶切电泳,结果显示 4 个转化子所含质粒双酶切后均获得 2.6 kb 和 2.2 kb 的两个片段,符合重组质粒 pLac03-*pul3665* 应有特征(图 1(a))。图 1(b)是其中一个转化子的质粒的酶切电泳图,该质粒转化子命名为大肠杆菌 JM109/pLac03-*pul3665*,简称 JM109/pLac03-*pul3665*,用于重组酶的表达。



1 :pLac03-*pul3665*/EcoRI;2:pLac03-*pul3665*/EcoRI+*XbaI*; M:DNA 标准相对分子质量 DL5 000

图 1 重组质粒 pLac03-*pul3665* 结构与酶切图谱

Fig. 1 Map and restriction analysis of pLac03-*pul3665*

将重组菌 JM109/pLac03-*pul3665* 和含空质粒的重组菌 JM109/pLac03 分别接种 TB 培养基培养并诱导表达,取不同的细胞成分检测普鲁兰酶酶

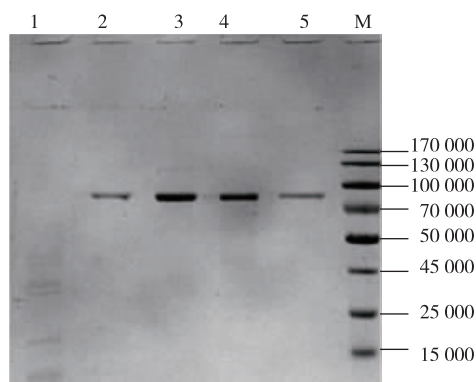
活。结果显示,含空质粒的对照菌 JM109/pLac03 细胞各组分中均未检测到普鲁兰酶酶活。重组菌 JM109/pLac03-*pul3665* 的各组分中均有明显的普鲁兰酶酶活,其中发酵液中的酶活大约为 6.8 U/mL,周质和胞质酶活分别为 8.5 U/mL 和 33.6 U/mL。可见,基因 *pul3665* 编码的蛋白质确实为普鲁兰酶,为便于叙述该蛋白质命名 PUL3665。表达载体 pLac03 本身并没有信号肽编码区,而 *pul3665* 表达产物大量分泌到周质和发酵液中,显然是在 PUL3665 自身信号肽控制下完成的。普鲁兰酶 PUL3665 的蛋白质序列与来源于嗜热脂肪地芽孢杆菌的普鲁兰酶 GsP 的同源性高达 83%,显然是同一类型的分子。用信号肽分析软件 SignalP 对两者进行分析,均未发现明显的信号肽,这两种分子很可能都是通过双精氨酸途径向细胞外分泌,对此我们在有关 GsP 蛋白的研究中进行了比较详细的论述^[11],作者主要研究 PUL3665 的应用性能,对此不再赘述。

2.2 重组酶 PUL3665 的纯化

由于发酵液中杂蛋白质相对较少,因此取发酵液浓缩后进行蛋白质纯化。重组菌的表达情况及纯化结果见图 2。由图 2 的 1、2 泳道比较可见, JM109/pLac03-*pul3665* 发酵液相比对照菌有一条明显的差异表达条带,用软件 Image Lab4.0 分析,这一差异条带代表的相对分子质量约 81 000,与根据 *pul3665* 基因序列推测的蛋白质的理论相对分子质量 81 100 一致,结合酶活分析可以进一步确认重组菌 JM109/pLac03-*pul3665* 表达产物为普鲁兰酶 PUL3665。进一步用离子交换层析及疏水柱层析纯化酶液,结果见图 2 中 3、4、5 泳道。泳道 3 是经过离子交换层析的结果,可见虽然蛋白质得到了一定的纯化但仍有杂带,4、5 泳道对应的是疏水柱纯化后两个收集管中的蛋白质的条带,均为单一条带,可见经过两次纯化后获得了电泳纯的重组酶 PUL3665。国内外对地芽孢杆菌属部分菌株来源的普鲁兰酶已有一定的报道^[11,16-17],但目前尚未见有关地衣芽孢杆菌普鲁兰酶重组表达及酶学性质的研究报道,因此取泳道 4 对应的收集管中的蛋白质进行纯酶酶学性质研究。

2.3 重组酶 PUL3665 酶学性质分析

在缓冲液 pH 6.5 的条件下测定温度对重组酶 PUL3665 酶活力的影响,结果见图 3。当反应温度由 40 ℃ 升至 55 ℃,重组酶的相对酶活逐渐升高。60 ℃



1:JM109/pLac-03 胞外组分;2:JM109/pLac03-pul3665 胞外组分;3:JM109/pLac03-pul3665 胞外组分离子交换层析后收集液;4,5:JM109/pLac03-pul3665 胞外组分疏水柱层析后收集液;M-蛋白质标准相对分子质量。

图2 重组酶 PUL3665 表达及纯化结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression and purification of the PUL3665

时,PUL3665 酶活明显低于 55 ℃时的酶活。当温度高于 60 ℃后,相对酶活迅速下降。

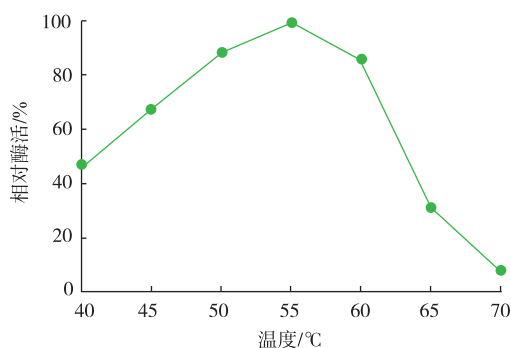


图3 温度对 PUL3665 酶活的影响

Fig. 3 Effects of temperature on the activity of PUL3665

在反应温度为 55 ℃时测定 pH 对酶活的影响,结果见图 4。PUL3665 的最适 pH 为 6.5,但在 pH 为 5.5~7.5 范围内时,重组酶的相对酶活均在最高酶活的 80%以上。结合最适温度检测结果,PUL3665 的最适反应条件为 55 ℃、pH 6.5,进一步结合所用样品纯酶蛋白质质量的测定结果可计算得到 PUL3665 纯酶在最适条件下的比酶活为 32 U/mg。对比文献对 GsP 的研究^[1],GsP 和 PUL3665 的最适 pH 均为 6.5,但 GsP 对 pH 变化很敏感,在 pH 5.5 和 pH 7.5 条件下其酶活只有最高酶活的 60%左右。GsP 的最适温度为 65 ℃,纯酶比酶活为 38 U/mg。可见 GsP 的热稳定性和比酶活优于 PUL3665,而

PUL3665 的 pH 适应性优于前者。

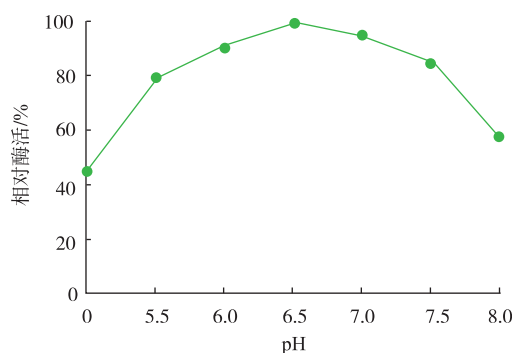


图4 pH 对 PUL3665 酶活的影响

Fig. 4 Effects of pH on the activity of PUL3665

在最适 pH 条件下,测定 PUL3665 的热稳定性,结果见图 5。50 ℃保温 5 h,相对酶活力可保持 80%。55 ℃保温 1 h,相对酶活力可保持约 80%以上,保温 2 h,相对酶活力可保持 60%。重组酶在 60 ℃失活较快,但保温 1 h 仍可保持 50%以上的酶活。

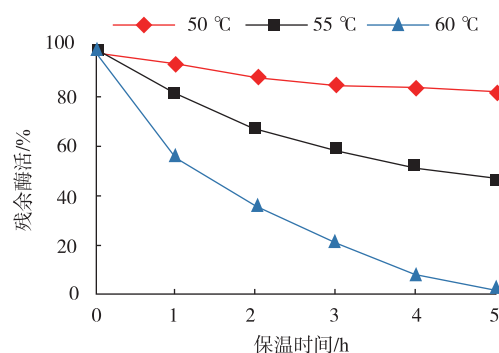


图5 PUL3665 的热稳定性

Fig. 5 Thermal stability of PUL3665

2.4 重组酶 PUL3665 对普鲁兰糖的降解

取过量普鲁兰酶作用于 1% 的普鲁兰多糖,其降解产物经 HPLC 分析结果见图 6。对照 1% 标准葡萄糖、麦芽二糖及麦芽三糖的响应值,只有在麦芽三糖处与标准的响应值相当。普鲁兰酶的降解产物中只有麦芽三糖。普鲁兰糖是一种多个麦芽三糖通过 α -1,6-糖苷键连接而成的多糖,对图 6 分析可知,PUL3665 不水解普鲁兰糖中麦芽三糖内部的 α -1,4-糖苷键。可溶性淀粉是一种葡萄糖,主要通过 α -1,4-糖苷键连接而成的多糖,与碘反应呈蓝色。进一步将 PUL3665 与 1% 的可溶性淀粉混合后长时间反应,结果显示反应液的蓝值没有明显的变

化,可见 PUL3665 不降解 α -1,4-糖苷键。上述实验可见,普鲁兰酶 PUL3665 只特异性水解 α -1,6-糖苷键,为 I 型普鲁兰酶。

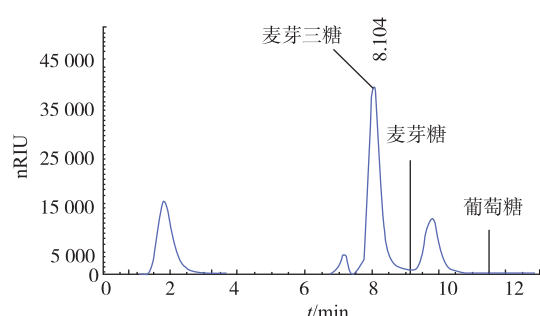


图 6 PUL3665 降解普鲁兰多糖的产物分析

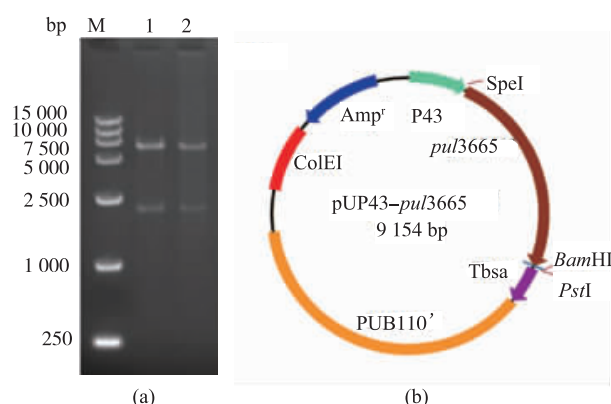
Fig. 6 Products of PUL3665 decomposition of pullulan

2.5 普鲁兰酶基因 *pul3665* 在枯草芽孢杆菌中的表达

从 PUL3665 酶学性质的分析可见,PUL3665 是一种具有比较宽泛 pH 适应性的 I 型普鲁兰酶,比较适合于粉丝制作工艺。枯草芽孢杆菌是一种公认为食品安全的微生物,相对于大肠杆菌具有更强的向细胞外分泌外源蛋白质的能力,显然更适合于表达用于粉丝制作的外源蛋白质。我们进一步以淀粉酶基因缺失的枯草芽孢杆菌 1A717 菌株为宿主对 PUL3665 进行异源表达。

以载体 pLac03-*pul3665* 为模板,以 PwX03、PwX04 为引物进行 PCR 扩增,获得 2.2 kb 的 *pul3665* 基因,用 *Spe*I 和 *Bam*HI 酶切后与经同样酶切的枯草芽孢杆菌表达载体 pUP43 连接,转化大肠杆菌 JM109。图 7(a)是其中 2 个转化子所含质粒的酶切图谱,图 7(b)是重组质粒 pUP43-*pul3665* 结构图。由图 7 可见,这两个质粒用 *Spe*I 和 *Bam*HI 酶切后获得两个条带,一条约 2.2 kb 与插入片段基因 *pul3665* 一致,另一条约 7.0 kb 的条带与 pUP43 空质粒一致,均符合 pUP43-*pul3665* 应有特征。大量提取重组质粒 pUP43-*pul3665* 转化枯草芽孢杆菌 1A717,在含卡那霉素的 LB 平板上检出转化子,任取 10 个转化子划线分离后提取质粒并将所提取的质粒再转化大肠杆菌 JM109,再一次从大肠杆菌转化子中提取质粒酶切电泳。结果显示,从上述 10 个枯草芽孢杆菌转化子中提取后又转回大肠杆菌的质粒的酶切电泳条带与图 7(a)中的条带完全一致,可见上述 10 个转化子都是 pUP43-*pul3665* 的转化子。取上述 10 个枯草芽孢杆菌转化子进行摇瓶发

酵,酶活检测显示,在 TB 培养基中 10 个转化子均有较高的酶活。含空质粒 pUP43 的重组菌则只有很微弱的酶活,这可能是枯草芽孢杆菌自身普鲁兰酶基因表达产物^[17]。取其中一株编号为 XWB08 的重组质粒的转化子命名为 *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XWB08,简称 XWB08,用于后续研究。



M:DNA 标准相对分子质量;1,2:pUP43-*pul3665*/*Spe*I+*Bam*HI.

图 7 重组质粒 pUP43-*pul3665* 结构与酶切图谱

Fig. 7 Map and restriction analysis of pUP43-*pul3665*

在 TB 培养基中进行发酵实验,结果见图 8。重组菌 XWB08 发酵至 48 h 时酶活达到最高值,为 113 U/mL,以后迅速下降,这可能源于宿主菌自身蛋白酶对外源蛋白质的降解^[19-20]。进一步取发酵液适当稀释后进行 SDS-PAGE 电泳,结果见图 9。相对于含 pUP43 空质粒的对照菌,含重组质粒的菌株 XWB08 在相对分子质量 81 000 附近有一明显的差异表达条带,该条带相对分子质量与 PUL3665 理论相对分子质量一致,结合酶活测定结果可以认定为枯草芽孢杆菌表达的 PUL3665 分子。

取各个发酵时间段的重组菌细胞,超声波破碎后检测细胞内酶活,结果显示,重组菌细胞内均未检测到酶活。同样条件下,取细胞破碎液进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示含 XWB08 和含空质粒的对照菌的蛋白质条带在 81 000 附近未发现明显的差异表达条带。酶活检测和 SDS-PAGE 电泳结果均显示,基因 *pul3665* 在枯草芽孢杆菌中的表达产物可以全部分泌到细胞外。这个结果与 *pul3665* 在大肠杆菌中的表达的情况基本一致,只是 PUL3665 在枯草芽孢杆菌中的分泌效率更高,可以全部分泌到细胞外。与 pLac03 一样,表达载体 pUP43 本身也没有

信号肽编码区, *pul3665* 表达产物在芽孢杆菌中的高效分泌显然是依靠自身结构实现的。

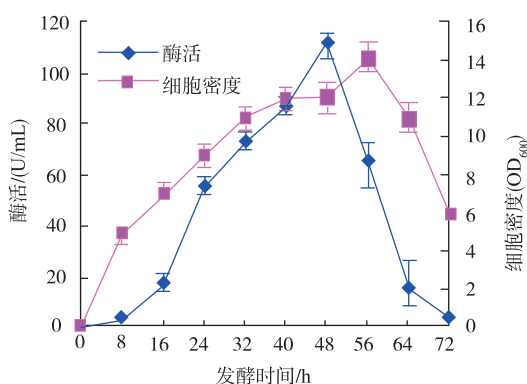
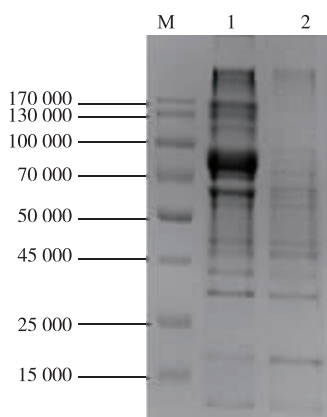


图 8 重组菌 *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XWB08 发酵进程

Fig. 8 Fermentation process of *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XWB08



M: 标准蛋白质相对分子质量; 1: 1A717/pUP43-*pul3665* 发酵上清液; 2: 1A717/pUP43 发酵上清液。

图 9 重组菌 *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XWB08 胞外蛋白质

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of extracellular protein of *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XWB08

2.6 普鲁兰酶 PUL3665 在红薯粉丝制作中的应用

将 XWB08 表达的普鲁兰酶用超滤机进行浓缩, 获得的浓缩酶液的酶活为 1 055 U/mL, 用于红薯粉丝的制作。由表 1 可见, 按传统方法进行粉丝制作时, 如果不添加普鲁兰酶或明矾, 在煮丝阶段粉丝间会发生比较严重的并条, 给后续理丝工作带来很大困难, 所制得的粉丝几乎都带有表面损伤, 难以进行后续试验。在制芡糊阶段按每克芡糊红薯粉使用 1 U 的 PUL3665, 则煮丝阶段的并条现象明显减少, 但由此制得的粉丝的断条率约为 15%, 未

能达到粉丝行业断条率 10% 以下的质量要求。如果加入 2 U 的 PUL3665 处理芡糊则并条和断条现象均进一步减少, 粉丝断条率降至 10 % 以下, 可以获得质量合格的粉丝。继续提高酶的用量, 产品质量不再有明显提高, 但也没有明显的负面影响。考虑生产成本, 用 PUL3665 制作粉丝时, 酶的用量以 2 U 为比较合适。表 2 是本课题组前期工作中获得的另一种中性普鲁兰酶 GsP^[10-11] 用于粉丝制作的情况。由表 2 可见, GsP 用于粉丝制作时, 使用效果与 PUL3665 基本一致, 其最适用量也是每克芡糊红薯粉加酶 2 U 为合适。表 3 所列是采用目前市场上可以购买得到的一种耐酸性普鲁兰酶 X 的实验结果, 从这个结果可知, 用市售普鲁兰酶 X 处理芡糊也能制作出质量合格的粉丝, 但存在两个方面的问题。首先是酶的用量比较大, 每克芡糊红薯粉的酶用量为 10 U。市售普鲁兰酶是针对制糖工艺开发的酸性普鲁兰酶, 这种酶在中性条件下不稳定, 这可能是酶的用量大的原因。根据本课题组了解, 这种普鲁兰酶来源于 *Bacillus deramificans*, 其最适 pH 为 4.0, 在其最适条件下酶活可以达到 3 800 U/mL, 而在 pH 6.5 条件下这种酶的酶活只有 320 U/mL, 这与文献报道的这种酶的性质基本一致^[15]。第二个问题是酶的用量需要严格控制, 酶的用量低于 5 U 或高于 20 U 都有可能出现严重并条或烂糊现象。过量使用普鲁兰酶 X 导致出现烂糊现象可能与这种普鲁兰酶中的淀粉酶有一定的关系。目前市售普鲁兰酶一般是用重组地衣芽孢杆菌生产的, 而地衣芽孢杆菌本身是耐高温 α -淀粉酶的生产菌, 因此普鲁兰酶产品中很可能有 α -淀粉酶。对此, 作者将 1% 的可溶性淀粉和上述 3 种普鲁兰酶混合后进行保温, 结果显示, PUL3665 或 GsP 和淀粉混合后, 混合液与碘反应后始终显示蓝色, 而普鲁兰酶 X 与淀粉的混合液与碘反应的颜色初期为蓝色, 大约 15 min 后变为浅黄色, 显示淀粉已经被降解。可见, 普鲁兰酶 X 中混杂的淀粉酶活性有可能对淀粉进行过度降解, 因此这种酶在粉丝制作中使用时需要严格控制用量。

红薯粉是一种未经纯化的初级农产品, 由于红薯品种、加工方法等的不同其品质差异很大, 其中之一是以红薯粉制成的芡糊的 pH 波动范围比较大。本课题组在江苏省东海县农村调查的情况看, 红薯粉制成的芡糊的 pH 一般在 6.0~7.0 之间, 但有

表 1 PUL3665 不同添加量对红薯粉丝质量的影响

Table 1 Effects of PUL3665 on the quality of sweet potato flourvermicelli

酶用量/(U/g 粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失/%
0	严重并条	未检测	未检出	未检测
1	部分并条	15±4	722±42	7.4±0.6
2	少量并条	7±2	737±17	8.2±0.5
4	少量并条	6.5±1.5	731±34	8.1±0.5
6	少量并条	5.5±1.5	755±20	8.7±0.8
10	少量并条	7±3	768±19	8.6±1.1
加明矾	少量并条	5±2	614±7	7.1±0.4

注:煮丝情况是指粉丝制作过程中的煮丝阶段的情况。严重并条是指煮丝时大部分粉丝条在沸水中互相粘连并条,并条的粉丝有些在随后的理丝阶段无法手工分开,有些虽然可以分开但粉丝表面形成损伤,一般难以得到表面无损伤的合格粉丝,导致进一步的粉丝成品质量检测无法进行;部分并条是指并条的粉丝在 10%以内;少量并条是指煮丝时并条粉丝一般在 2%以内。烂糊是指从粉丝机压出的粉丝条在沸水中解体,无法得到粉丝。

表 2 GsP 不同添加量对红薯粉丝质量的影响

Table 2 Effects of GsP on the quality of sweet potato flour vermicelli

酶用量/(U/g 粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失/%
0	严重并条	未检测	未检测	未检测
1	部分并条	16±3	728±31	7.0±1.6
2	少量并条	5.5±3.5	707±12	7.9±0.8
4	少量并条	6.5±1.5	744±35	7.5±0.2
6	少量并条	4.5±1.5	767±17	8.1±0.5
10	少量并条	6±4	777±28	8.3±0.4
加明矾	少量并条	6±1	608±13	5.1±0.2

表 3 普鲁兰酶 X 不同添加量对红薯粉丝质量的影响

Table 3 Effects of pullulanase X on the quality of sweet potato flourvermicelli

酶用量/(U/g 粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失/%
0	严重并条	未检测	未检测	未检测
5	严重并条	25±11	703±11	7.8±0.3
10	部分并条	7.5±2.5	711±12	8.1±0.9
20	少量并条	15±5	707±25	9.0±0.4
30	部分烂糊	未检测	未检测	未检测
40	烂糊	未检测	未检测	未检测
加明矾	少量并条	7±2	611±9	5.4±0.5

些农户家的红薯粉可以达到 pH 5.5 甚至更低,这可能会对酶的作用产生较大的影响,表 4—5 是一种 pH 5.5 的编号为 2 号的红薯面用于制作粉丝时普鲁兰酶 PUL3665 和 GsP 的作用效果。比较表 4、表 1 可见,以 2 号红薯粉为原料制作粉丝时,PUL3665 的作用效果与其作用于 1 号红薯粉的效果相当。比较表 5 和表 2 可见,以 2 号红薯粉为原料制作粉丝

时,GsP 的作用效果与作用于 1 号红薯粉的效果有明显差异,前者需要按照每克芡糊淀粉 4 U 的量添加酶处理 2 号红薯粉芡糊才能获得断条率在 10% 以下的成品粉丝。这个差异显然与两种普鲁兰酶对 pH 变化的适应性差异有关。GsP 对 pH 变化高度敏感,pH 5.5 时其酶活只有最适条件 pH 6.5 时酶活的 60%,而 PUL3665 则对 pH 变化相对不敏感,在

表 4 PUL3665 不同添加量对红薯粉丝质量的影响

Table 4 Effects of PUL3665 on the quality of sweet potato flour vermicelli

酶用量/(U/g 粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失/%
0	严重并条	未检测	未检测	未检测
1	部分并条	13±4	754±19	8.0±2.1
2	少量并条	6.5±2.5	777±22	6.4±1.0
4	少量并条	3.5±1.5	798±17	6.7±0.3
6	少量并条	4.5±0.5	790±11	6.9±0.2
10	少量并条	7±2	801±15	7.1±0.5
加明矾	少量并条	1.5±1.5	642±9	5.6±0.4

表 5 GsP 不同添加量对红薯粉丝质量的影响

Table 5 Effects of GsP on the quality of sweet potato flour vermicelli

酶用量/(U/g 粉)	煮丝情况	断条率/%	膨润度/%	蒸煮损失/%
0	严重并条	未检测	未检测	未检测
1	部分并条	22±10	790±23	9.1±0.3
2	部分并条	15.5±3.5	767±13	8.0±0.7
4	少量并条	6±1	792±9	6.7±0.3
6	少量并条	4±1	798±13	7.1±0.2
10	少量并条	6±2	793±15	7.0±0.6
加明矾	少量并条	2±1	654±11	5.2±0.1

pH 5.5~7.5 的范围内其酶活均在最高酶活的 80% 以上。

3 结 语

作者克隆了地衣芽孢杆菌 XQ3665 的普鲁兰酶基因 *pul3665* 并实现了异源表达, 获得了重组酶 PUL3665。PUL3665 是一种 I 型普鲁兰酶, 最适温度为 55 ℃, 比酶活 32 U/mg。与本课题组前期研究过的另一种地衣芽孢杆菌来源的普鲁兰酶 GsP 相比, PUL3665 最重要的特点是其具有较为宽泛的 pH 适应范围, 在 pH 5.5~7.5 范围内其酶活均在最高酶活的 80% 以上。这一特点使这种酶在原料成分复杂、品质变化较大的红薯粉为原料的粉丝制作中表现出一定的优势。目前, 粉丝的传统生产工艺的主要应用场所是农村小作坊, 其原料大多从农户家中收购, 产品品质变化大, 而由于条件所限也很难对原料性质进行分析和质量控制, 因此很难根据原料的变化对酶的使用量和使用方法进行调整。针对这种情况, 酶的使用效果的稳定性就成为影响其将来市

场推广的重要因素。作者选择了 pH 为 6.5 和 5.5 的 1 号和 2 号两种红薯粉进行粉丝制作的试验, 初步研究结果显示, PUL3665 的最适用量均为每克芡糊粉 2 U, 而用 GsP 的最适用量则前者为 2 U 后者为 4 U, 初步证明在红薯粉丝制作中 PUL3665 使用效果更为稳定。

构建的重组菌 *B. subtilis* 1A717/pUP43-*pul3665* XW08 在未经优化的摇瓶发酵条件下发酵后最高酶活为 113 U/mL, 重组酶全部分泌到发酵液中, 便于产品的提取。XW08 的发酵液经超滤获得的浓缩酶液的活力为 1 055 U/mL。在红薯粉丝制作中, 酶的用量为每克芡糊粉 2 U。芡糊粉一般占粉丝红薯粉总量的 10%, 即每千克粉丝中酶的用量为 200 U, 相当于浓缩酶液 0.19 mL, 即添加量为 0.019%, 这个添加量远低于明矾或目前已见报道的其它明矾替代物的添加量, 如果考虑酶液中绝大部分为水, 则实际干物质的添加量更小。酶是一种蛋白质, 一般来讲在加热变性后与普通蛋白质并没有不同。普鲁兰酶水解芡糊的产物为直链淀粉, 蛋白质和直链淀粉

都是红薯粉的正常成分,因此从食品安全角度考虑,普鲁兰酶水解芡糊是一种值得重视的粉丝制作方法。

综上所述,PUL3665 有希望开发成一种用量小、使用效果稳定的新型明矾替代物。

参考文献:

- [1] 陈洪兴,顾正彪,洪雁. 粉丝的原料、生产工艺即发展趋势[J]. 食品工业科技,2003,24(7):94-96.
- [2] 胡肖容,廖卢艳. 粉丝品质的研究进展[J]. 粮食与油脂,2016,29(3):5-7.
- [3] 金茂国,吴嘉根,吴旭初. 粉丝生产用淀粉性质及其与粉丝品质关系的研究[J]. 无锡轻工业学院学报,1995,14(4):307-312.
- [4] 杨正林,傅四清. 面食及淀粉类食品中铝含量调查[J]. 中国食品卫生杂志,2015,27(A1):37-39.
- [5] 杨书珍,于康宁,黄启星,等. 明矾替代物对甘薯粉丝品质的影响[J]. 中国粮油学报,2009,24(10):54-58.
- [6] 岳晓霞,王梁,刘广,等. 五种食品添加剂对马铃薯粉丝品质特性的影响[J]. 中国调味品,2013,38(10):32-35.
- [7] HAN J A, SINGH J, SINGH N. Utilization of rice starch with gums in Asian starch noodle preparation and noodle making properties of corn and potato starches[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2011, 20(5): 1173-1178.
- [8] 王梅桂,何文生,冯磊,等. 银杏粉丝加工中添加剂的研究[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(7):726-733.
- [9] 刘程玲,胡煜莹,王力翔,等. 普鲁兰酶解处理红薯淀粉及其性质研究[J]. 中国粮油学报,2018,33(2):6-11.
- [10] 沈微,肖亚朋,王兵波,等. 一种以淀粉支链水解酶替代明矾的酶法粉丝制作方法[P]. 中国专利:201510439893.4,2015-07-24.
- [11] 肖亚朋,沈微,李婷霖等. 嗜热脂肪土芽孢杆菌普鲁兰酶基因的异源表达及重组酶性质[J]. 食品与发酵工业,2017,43(5):30-36.
- [12] 沈微,王婕,肖亚朋,等. 一种以中性普鲁兰酶催化酶法制备粉丝的方法[P]. 中国专利:201710387714.6,2017-05-27.
- [13] ANAGNOSTOPOULOS C, SPIZIZEN J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1961, 81(5):741-746.
- [14] 沈微,俞玲,陈献忠,等. 麦芽糖 α -淀粉酶基因在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[J]. 食品与发酵工业,2011,37(6):1-5.
- [15] 王兵波,沈微,钱灵紫,等. 一种密码子优化的酸性普鲁兰酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达[J]. 食品与发酵工业,2016,42(7):9-15.
- [16] AYADI D Z, ALI M B, JEMLI S, et al. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 78(3):473-481.
- [17] LI L M, DONG F Y, LIN L, et al. N-terminal domain truncation and domain insertion-based engineering of a novel thermostable type I pullulanase from *Geobacillus thermocatenulatus*[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 2018, 66 (41):10788-10798.
- [18] MALLE D, ITOH T, HASHIMOTO W, et al. Overexpression, purification and preliminary X-Ray of pullulanase from *Bacillus subtilis* strain 168[J]. **Acta Crystallographica**, 2006, 62(4):381-384.
- [19] WONG S L, YE R, NATHOO S. Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 1994, 60(2):517-523.
- [20] WONG S L. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous protein [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 1995, 6(5):517-522.