

嗜热杜邦菌 α -淀粉酶的定向进化及高效表达

靳燕, 李延啸, 马俊文, 王玉川, 闫巧娟, 江正强

Directed Evolution and High-level Expression of α -Amylase from *Thermomyces dupontii*

JIN Yan, LI Yanxiao, MA Junwen, WANG Yuchuan, YAN Qiaojuan, and JIANG Zhengqiang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021100086>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

D407A/D430A双位点突变对嗜热酸性生淀粉 α -淀粉酶GTamy酶学性质的影响

Effects of Double Point Mutation D407A/D430A on the Enzymatic Properties of Thermoacidiphilic Raw Starch Degrading α -amylase GTamy

食品工业科技. 2018, 39(14): 103-109

马克斯克鲁维酵母高密度发酵条件的优化研究

Optimization of high density fermentation conditions of *Kluyveromyces marxianus*

食品工业科技. 2017(17): 111-118

异淀粉酶产生菌的分离鉴定及异淀粉酶基因的克隆表达

Isolation and Identification of Isoamylase Producing Strains and Cloning and Expression of Isoamylase Gene

食品工业科技. 2018, 39(17): 122-127

嗜热酸性普鲁兰水解酶Ⅲ的高效分泌表达及其酶学性质

Efficient Secretory Expression of Thermoacidiphilic Type III Pullulan Hydrolase and Its Enzymatic Properties

食品工业科技. 2020, 41(3): 98-103,109

*spoIIE*基因缺失对克劳氏芽孢杆菌淀粉酶酶活的影响

Effect of *spoIIE* Gene deletion on Amylase Activity in *Bacillus clausii*

食品工业科技. 2019, 40(1): 131-135,268

毕赤酵母组成型高效表达启动子的筛选鉴定

Screening and Identification of Constitutive Promoter for High-Level Expression in *Pichia pastoris*

食品工业科技. 2018, 39(13): 110-116



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

靳燕, 李延啸, 马俊文, 等. 嗜热杜邦菌 α -淀粉酶的定向进化及高效表达 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(13): 139–147. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100086

JIN Yan, LI Yanxiao, MA Junwen, et al. Directed Evolution and High-level Expression of α -Amylase from *Thermomyces dupontii*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(13): 139–147. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100086

· 生物工程 ·

嗜热杜邦菌 α -淀粉酶的定向进化及高效表达

靳燕¹, 李延啸¹, 马俊文¹, 王玉川², 闫巧娟¹, 江正强^{2,3,*}

(1. 中国农业大学工学院, 中国轻工业食品生物工程重点实验室, 北京 100083;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

3. 南京财经大学食品科学与工程学院/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏南京 210023)

摘要:目的: 对嗜热杜邦菌来源 α -淀粉酶进行分子改造, 以提高其耐热性和产酶水平。方法: 基于易错 PCR 技术构建嗜热杜邦菌来源 α -淀粉酶 (Td-amy) 的随机突变文库, 高通量筛选耐热性和比酶活提高的突变体, 通过定点突变及同源结构模拟对突变体进行分析, 并将其在毕赤酵母中表达。结果: 筛选得到一个正向突变体 (mTd-amy)。该突变体最适温度 (60 °C) 较野生型 (55 °C) 提高了 5 °C, 比酶活 (466.3 U/mg) 较野生型 (227.9 U/mg) 提高至 2.0 倍。经序列对比, mTd-amy 有四个氨基酸发生了变化, 分别为 Ala4Val、Ala122Val、Lys194Arg 和 Ala468Asp, 定点突变结果表明 Ala122Val 和 Ala468Asp 位点为影响其比酶活和最适反应温度的关键。进一步将突变体 mTd-amy 在毕赤酵母中高效表达, 经高密度发酵其酶活达 64696 U/mL。结论: 定向进化获得了嗜热杜邦菌来源 α -淀粉酶的正向突变体, 该突变体的最适温度和比酶活力均明显提高, 为 α -淀粉酶的分子改造以及工业化应用等提供了理论参考。

关键词: α -淀粉酶, 定向进化, 比酶活, 定点突变, 高密度发酵, 嗜热杜邦菌

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)13-0139-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021100086

本文网刊:



Directed Evolution and High-level Expression of α -Amylase from *Thermomyces dupontii*

JIN Yan¹, LI Yanxiao¹, MA Junwen¹, WANG Yuchuan², YAN Qiaojuan¹, JIANG Zhengqiang^{2,3,*}

(1. Key Laboratory of Food Bioengineering (China National Light Industry), College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

3. College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics/Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210023, China)

Abstract: Objective: The α -amylase from *Thermomyces dupontii* was modified by direct evolution to improve its thermostability and expression level. Methods: A mutation library of α -amylase (Td-amy) from *Thermomyces dupontii* was constructed by error-prone PCR. The mutants with higher thermostability and specific activity were selected through high-throughput screening, analysis of the mutants by site-directed mutagenesis and homologous structure simulation, and expression in *Pichia pastoris*. Results: A positive mutant (mTd-amy) was selected. The optimal temperature of mTd-amy was 60 °C, which was higher than that of the wild type enzyme Td-amy (55 °C) by 5 °C. The specific activity of mTd-amy (466.3 U/mg) was 2.0 times higher than that of Td-amy (227.9 U/mg). Sequence and mutation analysis revealed that four sites (Ala4Val, Ala122Val, Lys194Arg and Ala468Asp) in mTd-amy were mutated, and Ala122 Val and Ala468Asp played a key role in the specific activity and optimal temperature of the mutant. mTd-amy was further expressed in *Pichia pastoris*,

收稿日期: 2021-10-13

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2021YFC2100302)。

作者简介: 靳燕 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工, E-mail: 1347423450@qq.com。

* 通信作者: 江正强 (1971-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: Zhqjiang@cau.edu.cn。

and its expression level was up to 64696 U/mL through high cell density fermentation. Conclusion: Through directed evolution, a positive mutant of with high optimal temperature and specific activity was obtained. It provides a theoretical basis for the molecular modification and industrial application of α -amylase.

Key words: α -amylase; directed evolution; specific activity; site-directed mutation; high cell density fermentation; *Thermomyces dupontii*

淀粉是地球中储量最丰富的可再生资源之一^[1], 是一种天然的葡萄糖聚合物, 主要包括两种类型: 直链淀粉和支链淀粉。 α -淀粉酶(EC.3.2.1.1)可以随机水解淀粉分子内部的 α -1,4-糖苷键, 生成短链糊精、麦芽寡糖和少量葡萄糖, 因其生产成本低、pH 适用范围广、热稳定性性能好^[2] 等优点而在淀粉糖^[3]、酿造^[4] 和面包烘焙等食品工业中广泛应用。

分子改造技术能提高已有 α -淀粉酶的热稳定性和比酶活等酶学特性, 是提升 α -淀粉酶工业应用价值的有效方法之一^[5]。目前, 许多研究报道了 α -淀粉酶的分子改造, 常用的方法包括定向进化、定点突变和理性设计等。其中, 定向进化无需了解蛋白酶结构功能关系, 可快速建立突变体文库, 通过高通量筛选, 能有效改良酶的功能^[5-6]。如 HUANG 等^[7] 利用定向进化技术对地衣芽孢杆菌来源的 α -淀粉酶(BSA) 进行分子改造, 获得了一个耐酸性提高的突变体 G81R, 在 pH4.5 下孵育 40 min 后仍然保留 10% 的初始酶活, 而相同条件下的野生型淀粉酶已经基本没有活性。WU 等^[8] 利用易错 PCR 对解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) 来源的液化 α -淀粉酶(BAA) 进行分子改造, 有效降低了突变体对 Ca^{2+} 的依赖性, 且突变体的催化效率(k_{cat}/K_m)较野生型提高了 2.4 倍。刘雪莲等^[9] 利用 DNA 重排技术构建地衣芽孢杆菌来源的 α -淀粉酶突变文库, 筛选得到最适温度提高 10 °C、最适 pH 降低 0.5~1 个单位且对 Ca^{2+} 依赖性降低的突变体 V-2。此外, 基于基因工程技术进行异源表达是实现 α -淀粉酶高产量的重要途径之一。毕赤酵母表达系统因具有高效表达、胞外分泌等优势而受到广大研究者和生产者的关注。如赵宁等^[10] 将嗜热真菌樟绒枝霉(*Malbranchea cinnamomea*) 来源的 α -淀粉酶在毕赤酵母中高效表达, 高密度发酵至 168 h 时, 胞外酶活力达到 13440.6 U/mL。WANG 等^[11] 将米黑根毛霉来源的 α -淀粉酶在毕赤酵母中高效表达, 发酵 168 h 后, 其酶活达 29794.2 U/mL。WANG 等^[12] 将嗜热杜邦菌来源的 α -淀粉酶在毕赤酵母中高效表达, 发酵 168 h 后, 其酶活达 38314 U/mL。迄今, 已有较多 α -淀粉酶在毕赤酵母系统中成功表达, 但达到工业化生产水平的不多。因此, 基于定向进化技术获得一个稳定性和比酶活力同时提高的 α -淀粉酶突变体具有重要意义。

前期研究了嗜热杜邦菌(*Thermomyces dupontii*) 来源的 GH13 家族 α -淀粉酶(Td-amy) 的酶学性质和异源表达^[11]。该酶具有优良的水解特性, 在焙烤食品等领域具有良好的应用潜力, 但是该酶的热稳定性和

比酶活较低。本研究利用易错 PCR 及定向进化技术对 Td-amy 进行分子改造, 构建随机突变文库, 经高通量筛选以期筛选得到耐热性和比酶活同时提高的突变体, 并通过定点突变分析各突变氨基酸对其酶学性质的影响, 最后将改造后的 α -淀粉酶在毕赤酵母中高效表达, 为淀粉酶的大规模工业化生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

嗜热杜邦菌 本实验室筛选保藏; 载有嗜热杜邦菌来源 α -淀粉酶基因的重组质粒 pPIC9k-Td-amy 和重组质粒 pET28a-Td-amy 本实验室构建并保存; 克隆表达宿主大肠杆菌工程菌株 DH5 α 和 Rosetta (DE3) 北京博迈德基因技术有限公司; 表达载体 pET-28a(+) Novagen; 毕赤酵母 GS115 北京全式金生物技术有限公司; 载体 pPIC9K 美国 Invitrogen; Fast Pfu DNA 聚合酶(500 U/mL) 北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶 BamHI(20000 U/mL)、NdeI(20000 U/mL)、AvrII(20000 U/mL)、SnaBI(20000 U/mL)、SalI(10000 U/mL) 和 T4 DNA 连接酶(1000 U/mL)

美国 NEB 公司; 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒 北京博迈德基因技术有限公司; 高纯质粒小量提取试剂盒 北京天根生物科技有限公司; 酵母膏和胰蛋白胨 Oxoid 公司; DNS 北京索莱宝科技有限公司; 溶菌酶(20000 U/mg)、可溶性淀粉、NaCl、柠檬酸、柠檬酸三钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、2-吗啉乙磺酸(MES)、2-环己基氨基乙磺酸(CHES)、3-环己基-1-丙磺酸(CAPS)和咪唑 美国 sigma 公司; Geneticin(G418)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素和氨苄青霉素 美国 Inalco; 其它试剂若无特殊说明均是国产分析纯。

MD 平板培养基(g/L): 10 \times 葡萄糖(20%, w/v) 100 mL, 10 \times YNB(13.4%, w/v) 100 mL, 500 \times 生物素(0.02 g/L) 2 mL, 琼脂粉 15 g; LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, NaCl 10 g; LB 平板培养基(g/L): LB 液体培养基, 琼脂粉 15 g; YPD 液体培养基(g/L): 酵母提取物 10 g, 胰蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g(葡萄糖与其他成分分开灭菌); YPD-G418 平板培养基(g/L): YPD 液体培养基, 琼脂粉 15 g, 1~4 mg/mL G418。

Gene Pulser MXcell 电转仪、PCR MyCycler 自动扩增仪和 Power Pac BasicTM 型电泳仪 美国 BIO-RAD 公司; TGL 12GB 高速台式离心机 上海

安亭科学仪器厂; TU 1800PC 紫外分光光度计 北京普析通用仪器设备有限公司; 金属亲和层析柱料 Ni-NTA agarose 德国 Qiagen 公司; 国强 5 L 高密度发酵罐 上海国强生化工程设备有限公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机 宁波新芝生物科技股份有限公司; HZQ-X100 恒温摇床 江苏太仓实验设备厂; 酶标仪 赛默飞世尔科技公司; XMTD-6000 恒温水浴锅 北京长风仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 α -淀粉酶(Td-amy)随机突变文库的建立及高通量筛选

1.2.1.1 α -淀粉酶(Td-amy)随机突变文库的建立
易错 PCR 反应体系如下: 0.1 mmol/L Mn^{2+} /0.2 mmol/L Mn^{2+} 1 μ L, 5 mmol/L Mg^{2+} 1 μ L, 0.2 mmol/L dGTP 和 dATP 各 1 μ L, 1.0 mmol/L dCTP 和 dTTP 各 1 μ L, 0.2 μ mol/L Td-amy-F 和 Td-amy-R 各 1 μ L(见表 1), 1.25 U rTaq DNA 聚合酶 1 μ L, 5 ng pPIC9K-Td-amy 重组质粒 1 μ L, 5x pfu buffer 10 μ L, 剩余用超纯水补足至 50 μ L。易错 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C, 3 min; 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s; 反应循环 34 次; 72 $^{\circ}$ C, 10 min。

表 1 本文所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'-3')
Td-amy-F	ACTGCGATCGGATCCGCGACCCCGGTGAG
Td-amy-R	GATACATCGCAAGCTTCTACGCGGACGCACACA
A4VF	GCGACCCCGCTGAGTGGAAG
A4VR	CTTTCACCTCAGCCGGGGTCGC
A121F	CGACGTCGTGGCTAATCATTGCTACGGCGG
A121VR	AGCCACGACGTCGACCATGAGAAGCATCCCACG
K194RF	CGACTGGATCAAGAGTCTGGTGGCAACTACTC
K194RR	CTTGATCCAGTCGTTGAAGAGTTGCCTGACCTC
A467DF	CTCCAGTTGGCCGAGAGCGGTCTGTGTGCGTC
A467DR	GGCCAACTGGGAGCTCGGATAGAGACGCTTGG
mTd-amyF	ACTGCGATTACGTAGCGACCCCGTTGAGTGG
mTd-amyR	GATACATCGCCCTAGGCTACGCGGACGCACACAGAC

注: 下划线为酶切位点及突变位点。

易错 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证正确后进行胶回收, 胶回收产物与 pET28a 质粒用相同的限制性酶 BamHI 和 HindIII 在 37 $^{\circ}$ C 下双酶切处理, 并在 T₄ DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 过夜连接, 连接产物转大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将所有单菌落从平板刮取至新鲜 LB 培养基中, 摇菌提质粒转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 收集所有转化子, 即为随机突变文库。随机对 10 个转化子进行测序分析, 计算突变体文库的文库容量和突变量。

1.2.1.2 突变文库的初筛 将 96 孔板中加入 100 μ L 的含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 培养基, 之后用牙签挑取突变体接种至 96 孔板, 同时接种野生型作为对照, 37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 作为种子液。将 96 孔板中的菌液取 20 μ L 转接至新的装有 180 μ L 新鲜 LB 培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL)的 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h

后加入 IPTG 10 μ L 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 16 $^{\circ}$ C、180 r/min 诱导 16 h。4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min 获得菌体, 将菌体于-80 $^{\circ}$ C 冷冻 2 h 后于室温下复融, 加入 100 μ L 溶菌酶(10 mg/mL), pH8.0、37 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 再于 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min, 获得上清液即为粗酶液。

在 96 孔深孔板中加入 90 μ L 1%(w/v)可溶性淀粉(50 mmol/L MES 缓冲液, pH6.5), 然后加入 10 μ L 的粗酶液, 置于 55 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 加入 100 μ L 的 DNS 终止反应。将上述反应液于沸水浴煮 10 min, 冷却至室温后, 3000 r/min 离心 10 min 后取上清用酶标仪测酶活。选择酶活高于对照的菌株用于下一步的复筛。

1.2.1.3 突变文库的复筛 选取初筛为阳性的克隆接种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下培养, 取 1 mL 菌液在 600 nm 处测吸光度值。当其 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8, 加入 10 μ L IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L 进行重组酶的诱导表达。分别测定不同菌株粗酶液的酶学性质。以最适温度和酶活升高的突变体作为正向突变体。

1.2.2 mTd-amy 的纯化和酶学性质分析

1.2.2.1 纯化 粗酶液使用 Ni-IDA 柱(1 cm \times 5 cm)纯化。先用 10 个柱体积的缓冲液 A(20 mmol/L 磷酸盐缓冲液 PB, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH8.0)以 1.0 mL/min 的流速平衡柱子, 粗酶液以 0.5 mL/min 流速上样; 用缓冲液 A 以 1.0 mL/min 流速洗脱至 OD₂₈₀<0.05, 除去杂蛋白, 然后分别用洗脱缓冲液 B(20 mmol/L PB, 500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH8.0)和缓冲液 C(20 mmol/L PB, 500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑, pH8.0)以 1.0 mL/min 洗脱并收集目的蛋白。洗脱后经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检验其纯度。

1.2.2.2 酶活力和蛋白浓度的测定 α -淀粉酶酶活力的测定采用 DNS 法(3,5-二硝基水杨酸法)^[13]: 将酶液用 MES 缓冲液(50 mmol/L, pH6.5)进行适当稀释, 吸取 100 μ L 适当稀释的酶液至 900 μ L 可溶性淀粉溶液(1.0%, w/v, 50 mmol/L MES 缓冲液, pH6.5)中, 振荡均匀后, 在 55 $^{\circ}$ C 下反应 10 min, 加入 1 mL DNS 溶液终止反应, 于沸水浴中加热 10 min, 测定 OD₅₄₀ 条件下的吸光度值, 并使用葡萄糖作为标准。 α -淀粉酶酶活力定义为: 在以上反应条件下, 每分钟产生 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 U。蛋白质浓度测定参考 LOWRY 等^[14]的方法。Folin 甲 A 液和 Folin 甲 B 液按 50:1 比例混合, 每个样品加 1 mL 上述混合液和 100 μ L 适当稀释的酶液, 轻振荡后室温静置 10 min, 加入 100 μ L Folin 乙, 迅速振荡后于 37 $^{\circ}$ C 水浴静置 30 min 后于 OD₆₅₀ 处测定吸光度值。以牛血清蛋白(BSA)为标准品制作标准曲线。

1.2.2.3 野生型 Td-amy 及突变体 mTd-amy 酶学性质的测定 a.最适 pH 及 pH 稳定性:在 50 ℃(Td-amy)、55 ℃(mTd-amy)50 mmol/L 不同 pH 的缓冲溶液中测定纯酶的酶活以确定其最适 pH。所选择的缓冲体系分别为:柠檬酸盐缓冲液(pH3.0~5.0)、MES 缓冲液(pH5.5~6.5)、磷酸盐缓冲液(pH7.0~8.0)、CHES 缓冲液(pH8.5~10.0)、CAPS 缓冲液(pH10.5~11.0)。将酶液用上述不同体系不同 pH 的缓冲液稀释至 OD₅₄₀ 为 0.2~0.8,于 45 ℃ 水浴中保温 30 min,然后迅速置于冰水浴冷却 30 min,测定残余酶活力。

b.最适温度及热稳定性:最适温度的测定是将纯酶用 50 mmol/L、pH6.5 的 MES 缓冲溶液适当稀释,分别在 40~80 ℃ 下测定野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 酶活力,确定其最适温度。将纯酶用 50 mmol/L、pH6.5 的 MES 缓冲溶液适当稀释,在 40~80 ℃ 下孵育 30 min,然后于冰水浴中冷却 30 min 后,加热至 55 ℃(Td-amy)和 60 ℃(mTd-amy)测定残余酶活力。

1.2.2.4 底物特异性的测定 分别以 1.0%(w/v)可溶性淀粉、红薯淀粉、小麦淀粉、玉米淀粉和马铃薯淀粉为底物,测定野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 的底物特异性。分别在 55 ℃(Td-amy)和 60 ℃(mTd-amy)、pH6.5(50 mmol/L MES 缓冲液)的条件下反应 10 min。采用 DNS 法^[13]测定酶活,以可溶性淀粉为底物测得的酶活设定为 100%,每分钟反应生成 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量定义为 1 个酶活力单位。

1.2.3 α-淀粉酶(Td-amy)的定点突变及结构模拟分析 将筛选到的阳性突变体 α-淀粉酶基因(*mTd-amy*)测序后,与野生型基因(*Td-amy*)序列进行比对分析,确定阳性克隆的突变位点。根据突变位点信息,以野生型基因为出发点向阳性突变体的方向逐一进行定点突变。

定点突变以重组质粒 pET28a-Td-amy 为模板,用定点突变引物(表 1),PCR 扩增程序为:95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 20 s;72 ℃ 延伸 3 min,25 个循环;72 ℃ 总延伸 10 min。PCR 扩增产物经 DpnI 在 37 ℃ 条件下消化 2 h,直接转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞。将转化后的重组菌涂布于 LB 固体培养基(含卡那霉素 50 μg/mL),37 ℃ 培养 12 h,对单菌落进行菌落 PCR,并测序得到每个突变位点的 20 个突变体。收集质粒,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)。

以米曲霉(*A. oryzae*)来源的 Taka α-淀粉酶(PDB: 6XSJ,序列同源为 65.54%)结构为模板,经 SWISS-MODEL 进行同源结构模拟,得到 α-淀粉酶(Td-amy)结构,根据预测的结构信息对突变位点进行分析。利用 PyMOL 软件分析氨基酸残基间氢键相互作用和突变位点对蛋白质二级结构的影响。

1.2.4 mTd-amy 在毕赤酵母中表达及高密度发酵

1.2.4.1 mTd-amy 在毕赤酵母中表达 用限制性内切酶 SnaBI 和 AvrII 对淀粉酶突变体基因(*mTd-amy*)和载体 pPIC9K 双酶切,凝胶回收后连接获得重组质粒 pPIC9K-mTd-amy。重组质粒 pPIC9K-mTd-amy 用限制性内切酶 Sal I 线性化后电转化至巴斯德毕赤酵母 GS115 中。取 100~200 μL 电转化产物涂布于 MD 平板培养基,30 ℃ 下培养 2~3 d 后用无菌蒸馏水将 MD 平板上生长的毕赤酵母转化子洗脱和重悬。分别涂布于含有不同质量浓度的 YPD-G418 平板培养基上 30 ℃ 培养 2~5 d。挑取不同质量浓度 G418 平板培养基上的单菌落摇瓶发酵 3 d,吸取上清液检测淀粉酶酶活力。

1.2.4.2 突变体 mTd-amy 的高密度发酵 选取摇瓶发酵淀粉酶酶活力最高的重组菌株进行高密度发酵。发酵方法及培养基的配制参照毕赤酵母发酵手册(Version B, 053002, Invitrogen)操作。

1.3 数据处理

数据统计和图片处理采用 Origin 8.0 进行,数据均为 3 次平行。

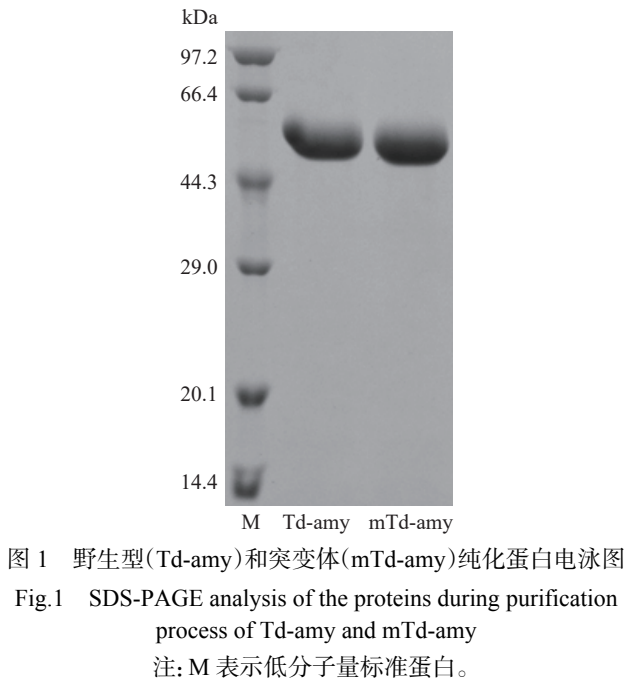
2 结果与讨论

2.1 α-淀粉酶突变文库的构建和筛选

采用 Mg²⁺和 Mn²⁺进行易错 PCR 扩增,与 pET28a 载体酶切连接构建重组质粒,并转化至大肠杆菌 DH5α,得到随机突变文库。随机对 10 个转化子进行测序分析,结果表明,当 Mg²⁺浓度为 5 mmol/L 和 Mn²⁺浓度为 0.1 mmol/L 时,随机突变文库中碱基突变率约为 0.21%,氨基酸突变率约为 0.63%,为合适突变率。经过两轮筛选,最终得到 1 个比酶活明显升高的正向突变体,命名为 mTd-amy。该突变体的比酶活为 466.3 U/mg,相对于野生型(227.90 U/mg)提高至 2.0 倍,测序结果表明,α-淀粉酶突变基因(*mTd-amy*)中有四个碱基发生改变,分别为 C11T、C365T、A581G 和 C1403A,导致该突变体中四个氨基酸发生改变,即 Ala4Val、Ala122Val、Lys194Arg 和 Ala468Asp。将野生型 α-淀粉酶基因(*Td-amy*)和突变体基因(*mTd-amy*)的氨基酸序列与其它 GH13 家族 α-淀粉酶进行序列比对,发现 Ala4Val、Ala122Val、Lys194Arg 为部分保守氨基酸,而 Ala468Asp 为非保守氨基酸。

2.2 野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 的酶学性质

2.2.1 最适条件的测定 将突变体 mTd-amy 纯化后,SDS-PAGE 结果分析表明目的蛋白条带均一,分子量为 61.2 kDa(图 1),与其预测分子量和野生型 Td-amy 分子量一致。对野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 酶学性质测定结果如图 2。mTd-amy 的最适 pH 为 6.5(图 2A),在 pH4.5~10.0 范围内保持稳定(图 2B),与野生型 Td-amy 研究结果一致^[12]。mTd-amy 的最适温度为 60 ℃(图 2C),较野生型(大肠杆菌中表达)提高了 5 ℃,明显高于许多不同来源的重组 α-淀粉酶,如来源于莱斯氏菌属(45 ℃)^[15]、



海洋专性放线菌(50℃)^[16]、柄篮状菌(50℃)^[17]和嗜碱溶淀粉性碱单胞菌(50℃)等^[18]; mTd-amy 在 55℃ 以下保持稳定, 在 55℃ 下保温 30 min 后仍能够残留 90% 左右的酶活力(图 2D), 而 Td-amy(大肠杆菌中表达)仅在 50℃ 以下保持稳定。另外, mTd-amy 在 65 和 70℃ 保温 30 min 后, 残余酶活分别为 27.3% 和 14.2%; 而经过相同处理后, Td-amy(在大肠杆菌中表达)的残余酶活分别仅为 16.3% 和 8.1%。这表明进化后突变体 mTd-amy 的最适温度和热稳定性均有所提高。

2.2.2 底物特异性 野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 对不同底物的特异性如表 2 所示。结果表明, 野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 对多种底物均有水解活性, 两者均对玉米淀粉的水解能力最强, 与丁梦瑶等^[19]对约氏黄杆菌 HSL13 中新型 α -淀粉酶的底物特异性研究一致, 其次是小麦淀粉、红薯淀粉和马铃薯淀粉。突变体 mTd-amy 对不同底物的比酶活均明显提高, 其中, 底物为马铃薯淀粉和可溶性淀粉时, 其比酶活都比野生型 Td-amy 提高了 2 倍以上。

表 2 野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 的底物特异性			
Table 2 Substrate specificity of Td-amy and mTd-amy			
底物	比酶活(U/mg)		提高倍数(mTd-amy/Td-amy)
	Td-amy	mTd-amy	
可溶性淀粉	227.9±4.9	466.2±7.6	2.0
小麦淀粉	375.8±1.8	560.1±3.6	1.5
红薯淀粉	298.3±8.1	487.6±7.6	1.6
玉米淀粉	397.8±4.1	621.6±4.3	1.6
马铃薯淀粉	198.3±1.6	441.7±9.0	2.2

2.3 定点突变及结构模拟分析

定点突变结果表明(表 3), 与野生型 Td-amy 相

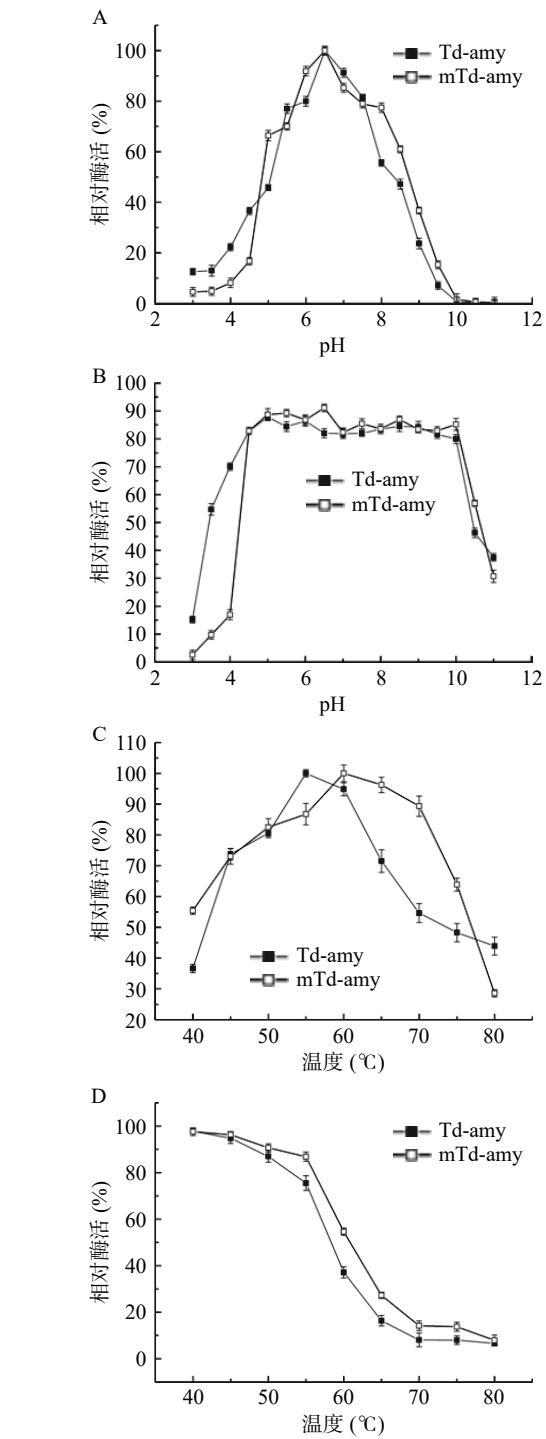


图 2 野生型 Td-amy 和突变体 mTd-amy 的最适 pH(A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)

Fig.2 Optimal pH (A), pH stabilities (B), optimal temperatures (C) and thermostabilities (D) of Td-amy and mTd-amy

比, 单突变体 Ala122 Val 的比酶活较野生型提高至 194.6%, 但低于突变体 mTd-amy(提高至 204.6%), 其余三个单突变体 Ala4Val、Lys194Arg 和 Ala468Asp 与野生型 Td-amy 相比, 比酶活明显降低。突变体 Ala122Val 和 Ala468Asp 的最适温度较野生型提高了 5℃。所有突变体最适 pH 未发生变化。推测第 122 位丙氨酸(Ala)突变和第 468 位丙氨酸(Ala)突变是影响 mTd-amy 酶学性质的关键。

经 SWISS-MODEL 同源结构模拟, 得到 α -淀粉

表 3 突变体 mTd-amy 的定点突变各个突变体的最适温度、最适 pH 及相对酶活

Table 3 The optimal temperature, optimal pH and relative enzyme activity of mutants for site-directed mutation of mTd-amy

菌株	最适温度(℃)	最适pH	相对比酶活(%)
Td-amy	55	6.5	100.0±1.7
Ala4Val	55	6.5	33.8±0.8
Ala122Val	60	6.5	194.6±2.1
Lys194Arg	55	6.5	46.1±1.1
Ala468Asp	60	6.5	32.5±2.4
mTd-amy	60	6.5	204.6±3.1

酶(Td-amy)的结构模型(图 3),与其他 GH13 家族 α -淀粉酶相似,Td-amy 呈现典型的(β/α)8-TIM 桶结构,C 端区域还包含有一个小的 β -片层结构,由 8 个 β -折叠和 1 个小的 α -螺旋结构组成。其中,Asp179、Glu232 和 Asp299 为关键催化氨基酸,位于 TIM 桶入口处。根据三维结构可知,该酶第 4 位的丙氨酸、第 194 赖氨酸和第 468 位的丙氨酸均位于酶分子的表面,而第 122 位的丙氨酸位于酶分子内部。

通常,蛋白质表面电荷的变化会影响蛋白质的折叠以及酶分子的催化特性^[20-21]。第 4 位电中性的丙氨酸突变为缬氨酸后,具有较大 β 侧链的氨基酸缬氨酸不利于 α 螺旋的稳定^[22],这可能是造成其比酶活降低的原因。第 194 位赖氨酸突变为精氨酸后,精氨酸有更长的侧链,增加了空间位阻,影响 α 螺旋的稳定,导致突变体酶活明显降低^[23]。第 468 位电中性的丙氨酸突变为负电性的天冬氨酸,导致该区域表面电荷由电中性变为弱负电性,推测可能是表面电荷的变化使其比酶活降低。另外,突变后第 468 位的天冬氨酸增加了与第 469 位精氨酸的相互作用力,有利于该 Loop 区的稳定,可能是导致其最

适温度提高的原因。虽然 122 位丙氨酸突变为缬氨酸没有导致酶分子相互作用和表面电荷的改变,但 A122 与三个催化氨基酸均位于催化凹槽入口处的 Loop 区域。由于 Loop 区是酶结构中最灵活的部分,酶的进化经常涉及它们在环区的残基变化^[24]。Loop 区域氨基酸的变化可能对底物的特异性结合产生了影响。另外,丙氨酸突变为缬氨酸后,稳定了底物结合区的空间结构,有利于底物的结合,既提高了酶活性,也提高了热稳定性^[25]。

虽然单突变体 Ala4Val、Lys194Arg 和 Ala468-Asp 比酶活都相对于野生型 Td-amy 有所降低,但四突变体 mTd-amy 的比酶活较野生型 Td-amy 提高 204.6%,说明单突变体的酶学性质经组合突变后并不一定产生叠加效应。这一结果与陈春等^[26]对来源于 *Arthrobacter ramosus* 的 MTHase 以及史然等^[27]对地杆菌来源的 α -L-岩藻糖苷酶进行定向进化的研究结果类似。

2.4 mTd-amy 的高密度发酵

突变体 mTd-amy 成功在毕赤酵母中高效表达,经 168 h 高密度发酵,发酵上清液的 α -淀粉酶酶活力和蛋白含量分别达 64696 U/mL 和 33.6 mg/mL,菌体湿重 439 mg/mL(图 4A)。发酵过程中发酵上清液的蛋白电泳如图 4B 所示,诱导开始,发酵上清液出现目的条带(61.2 kDa);随着诱导培养时间延长,目的条带逐渐变粗,发酵上清液中 mTd-amy 的蛋白含量逐渐增加。

突变体 mTd-amy 的产酶水平明显高于许多不同来源 α -淀粉酶在毕赤酵母中异源表达的产酶水平,如来源于米曲霉(72 U/mL)^[28]、微小根毛霉(8285 U/mL)^[29]、地衣芽孢杆菌(11000 U/mL)^[30]、米黑根毛霉(29794.2 U/mL)^[11]和微小胞根霉

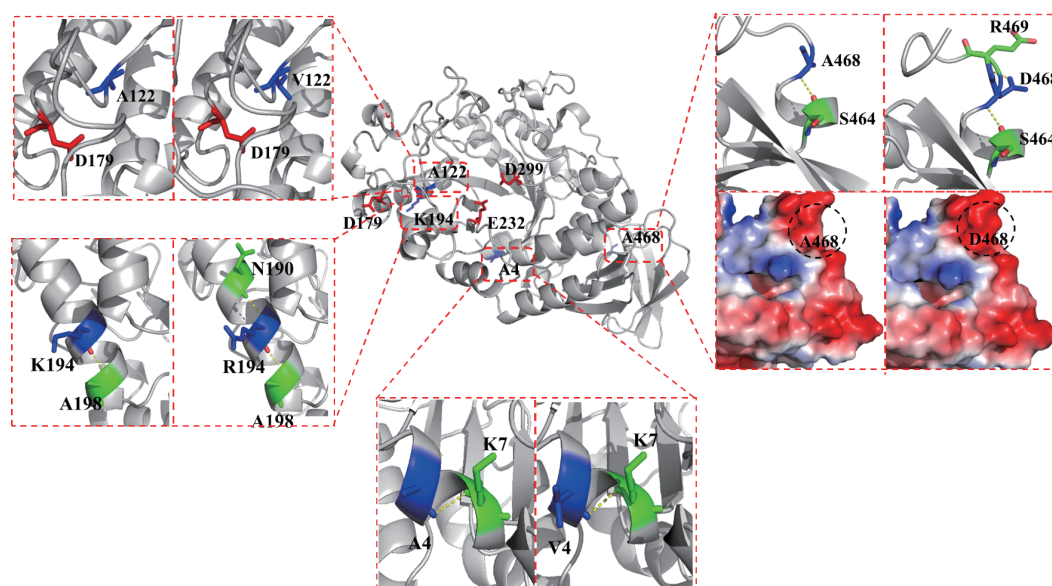


图 3 Td-amy 和 mTd-amy 的结构、改变位点、作用力和表面电荷分布示意图

Fig.3 Schematic diagram of structure, mutant sites, molecular force changes and surface charge distribution of Td-amy and mTd-amy

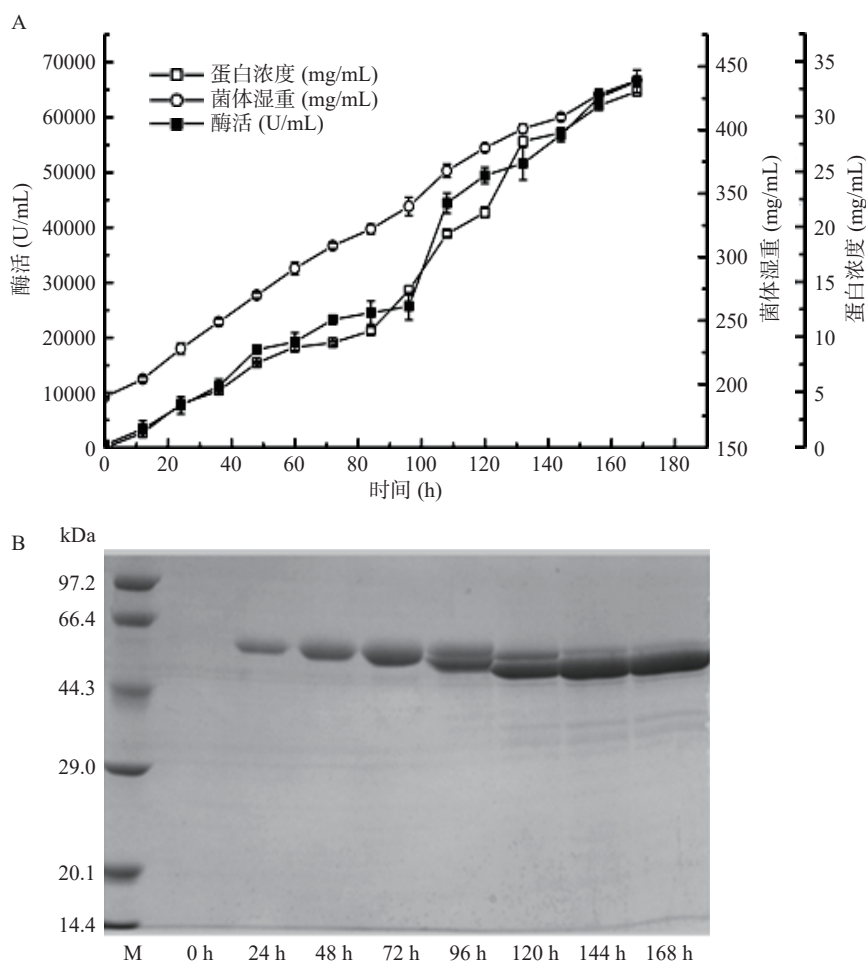


图 4 毕赤酵母高密度发酵产 α -淀粉酶(mTd-amy)历程图(A)和 SDS-PAGE 分析(B)

Fig.4 Time-course of mTd-amy expression in *P. pastoris* by high-cell density fermentation (A) and SDS-PAGE analysis (B)

(32100 U/mL)^[31]。此外, mTd-amy 的蛋白含量也明显高于许多不同来源重组 α -淀粉酶在毕赤酵母中表达的蛋白含量, 如米曲霉(0.4 mg/mL)^[32]、微小胞根霉(1.5 mg/mL)^[31] 和地衣芽孢杆菌(12.2 mg/mL)^[30]。可见, 突变体 mTd-amy 的高效表达为该酶的工业化生产奠定了基础。

3 结论与讨论

本研究基于定向进化及高通量筛选方法对嗜热杜邦菌来源 α -淀粉酶(Td-amy)进行分子改造研究, 成功筛选到正向突变体 mTd-amy, 其比酶活较野生型 Td-amy 提高至 2.0 倍, 最适温度较野生型 Td-amy 提高 5 °C, 热稳定性也有明显提升, 进一步将该酶在毕赤酵母中高效表达, 酶活水平达 64696 U/mL, 较野生型 Td-amy 提高 1.68 倍^[12]。ZHU 等^[33] 基于易错 PCR 技术对来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶进行随机突变得到突变体 G300H, 其比酶活仅提高了 9.6%。马银凤等^[34] 基于酶分子进化原理, 得到催化特性明显提高的突变体 E2M6, 其最适温度提高 5 °C, 但其比酶活没有明显改变。本文利用定向进化技术得到了最适温度和比酶活力同时改善的正向突变体 mTd-amy, 为淀粉酶的分子改造提供了理论依据。同时, 实现了该酶的高效表达, 为淀粉酶的大规模生产提供了实践基础。今后, 仍需对淀粉酶进

行更深入的分子改造, 以提高淀粉酶在不同应用中的适应性。

参考文献

- [1] KHELESTKIN V K, PELTEK S E, KOLCHANOV N A. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 181: 460–476.
- [2] 何亚洁. α -淀粉酶发酵生产影响因素的研究进展[J]. 现代食品, 2020(8): 68–69, 75. [HE Y J. Research progress on the factors affecting the fermentation production of α -amylase[J]. *Modern Food*, 2020(8): 68–69, 75.]
- [3] 韩承勇, 刘峰, 韩先卓, 等. 一种双酶法糖化制备超高麦芽糖的方法: 江苏省, CN111041054A[P]. 2020-04-21. [HAN C Y, LIU F, HAN X Z, et al. A method for preparing ultra-high maltose by double-enzyme saccharification: Jiangsu Province: CN111041054A [P]. 2020-04-21.]
- [4] 俞峰, 刘玉春, 柳加润, 等. 耐高温 α -淀粉酶在淀粉质酒精生产中的应用研究[J]. 酿酒, 2020, 47(5): 84–88. [YU F, LIU Y C, LIU J R, et al. Research on application of high temperature resistant α -amylase in starch alcohol production[J]. *Liquor Making*, 2020, 47(5): 84–88.]
- [5] AMOLD F H, VOLKOV A A. Directed evolution of biocatalysts[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3(1): 54–59.
- [6] TURNER N J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts[J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(8): 567–573.

- [7] HUANG L, SHAN M Y, MA J Y, et al. Directed evolution of α -amylase from *Bacillus licheniformis* to enhance its acid-stable performance[J]. *Biologia*, 2019, 74: 1363–1372.
- [8] WU H Y, TIAN X J, DONG Z X, et al. Engineering of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase with improved calcium independence and catalytic efficiency by error-prone PCR[J]. *Starch-starke*, 2018(70): 1700175.
- [9] 刘雪莲, 申培立, 牛丹丹, 等. 地衣芽胞杆菌 α -淀粉酶耐热耐酸突变体的酶学性质[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(2): 7–10.
- [10] LIU X L, SHEN P L, NIU D D, et al. Enzymatic properties of heat and acid tolerant mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(2): 7–10.
- [11] 赵宁, 王玉川, 易萍, 等. 樟绒枝霉 α -淀粉酶在毕赤酵母中的高效表达及在麦芽糖浆制备中的作用[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(2): 1–6.
- [12] ZHAO N, WANG Y C, YI P, et al. High-efficiency expression of *Cladosporium cinnamomea* α -amylase in *Pichia pastoris* and its role in the preparation of maltose syrup[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(2): 1–6.
- [13] WANG Y C, HU H F, MA J W, et al. A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305(Feb.1): 125447.1–125447.9.
- [14] WANG Y C, ZHAO N, MA J W, et al. High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 127: 683–692.
- [15] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Biochemistry*, 1959, 31(3): 426–428.
- [16] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951(193): 265–275.
- [17] 赵海燕, 宋晨斌, 刘正亚, 等. 来源于 *Laceyella* sp. 的 α -淀粉酶基因克隆、重组表达及酶学性质研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(8): 23–33.
- [18] ZHAO H Y, SONG C B, LIU Z Y, et al. The cloning, recombinant expression and enzymatic properties of α -amylase gene from *Laceyella* sp.[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(8): 23–33.
- [19] LIU S, AHMED S, FANG Y. Cloning, expression and characterization of a novel α -amylase from *Salinispora arenicola* CNP193[J]. *The Protein Journal*, 2019, 38(6): 716–722.
- [20] XIAO Z, WU M, GROSSE S, et al. Genome mining for new α -amylase and glucoamylase encoding sequences and high level expression of a glucoamylase from *Talaromyces stipitatus* for potential raw starch hydrolysis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172: 73–86.
- [21] YANG H, LIU L, SHIN H, et al. Comparative analysis of heterologous expression, biochemical characterization optimal production of an alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology Progress*, 2013(29): 39–47.
- [22] 丁梦瑶, 谢会芳, 杨江科. 约氏黄杆菌 HSL13 中新型 α -淀粉酶的表达及酶学性质初探[J]. *生物技术*, 2020, 30(6): 525–530, 524.
- [23] DING M Y, XIE H F, YANG J K. Expression of a novel α -amylase in *Flavobacterium johnsoniae* HSL13 and preliminary study on its enzymatic properties[J]. *Biotechnology*, 2020, 30(6): 525–530, 524.
- [24] LI Y X, YI P, YAN Q J, et al. Directed evolution of a β -mannanase from *Rhizomucor miehei* to improve catalytic activity in acidic and thermophilic conditions[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 143.
- [25] MAKHATADZE G I, LOLADZE V V, ERMOLENKO D N, et al. Contribution of surface salt bridges to protein stability: Guidelines for protein engineering[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 327: 1135–1148.
- [26] PIELA L, NEMETHY G, SCHERAGA H A. Proline-induced constraints in α -helices[J]. *Biopolymers*, 1987, 26(9): 1587–1600.
- [27] 陈国仁. 扩展青霉脂肪酶的定点突变及随机突变[D]. 福州: 福建师范大学, 2005.
- [28] CHEN G R. Site-directed mutation and random mutation of *Penicillium* extended lipase[D]. Fujian: Normal University, 2005.
- [29] HE X J, CHEN S Y, WU J P, et al. Highly efficient enzymatic synthesis of tert-butyl (S)-6-chloro-5-hydroxy-3-oxohexanoate with a mutant alcohol dehydrogenase of *Lactobacillus kefir*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(21): 8963–8975.
- [30] 姚婷, 李华钟, 房耀维, 等. 定点突变提高 *Thermococcus sibiriacus* HJ21 高温酸性 α -淀粉酶催化活性[J]. *食品科学*, 2011, 32(15): 5.
- [31] YAO T, LI H Z, FANG Y W, et al. Site-directed mutagenesis improves the catalytic activity of *Thermococcus sibiriacus* HJ21 high temperature acid α -amylase[J]. *Food Science*, 2011, 32(15): 5.
- [32] 陈春, 宿玲恰, 夏伟, 等. 定向进化提高来源于 *Arthrobacter ramosus* 的 MTHase 的热稳定性[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(3): 84–91.
- [33] CHEN C, SU L Q, XIA W, et al. Directed evolution improves the thermal stability of MTHase derived from *Arthrobacter ramosus*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(3): 84–91.
- [34] 史然, 张登娅, 谷懿寰, 等. 地杆菌 α -L-岩藻糖苷酶的分子改造及其在合成 2'-岩藻糖基乳糖中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(18): 135–142.
- [35] SHI R, ZHANG D Y, GU Y H, et al. Direct evolution of the α -L-fucosidase from *Pedobacter* sp. and its application in the synthesis of 2'-fucosyllactose[J]. *Food Science*, 2021, 42(18): 135–142.
- [36] TRABELSI S, SAHNOUN M, ELGHARBI F, et al. *Aspergillus oryzae* S2 AmyA amylase expression in *Pichia pastoris*: Production, purification and novel properties[J]. *Molecular Biology Reports*, 2018(46): 921–932.
- [37] HE Z, ZHANG L, MAO Y, et al. Cloning of a novel thermostable glucoamylase from thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* and high-level co-expression with α -amylase in *Pichia pastoris*[J]. *BMC Biotechnology*, 2014, 14: 114.
- [38] WANG J R, LI Y Y, LIU D N, et al. Codon optimization significantly improves the expression level of α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 248680.
- [39] 何正贵, 尹燕辰, 毛佑志, 等. 微小根毛霉耐热 α -淀粉酶基

因的克隆与高效表达[J]. 南方农业学报, 2014, 45(2): 165–172.

[HE Z G, YIN Y C, MAO Y Z, et al. Cloning and high-efficiency expression of heat-resistant α -amylase gene from *Rhizomucor pusillus*[J]. Southern Journal of Agricultural Sciences, 2014, 45(2): 165–172.]

[32] LI S, ZUO Z, NIU D, et al. Gene cloning, heterologous expression, and characterization of a high maltose-producing α -amylase of *Rhizopus oryzae*. [J]. [Applied Biochemistry Biotechnology](#), 2011, 164(5): 581–592.

[33] ZHU W, CAO Y, LI W, et al. The error-prone PCR of alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* toward enhanced acid tolerance and higher specific activity[J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2013, 7(3): 1489–1496.

[34] 马银凤, 申培立, 王彩喆, 等. 中温 α -淀粉酶的分子进化及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(11): 14–18. [MA Y F, SHEN P L, WANG C Z, et al. Molecular evolution and biochemical characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(11): 14–18.]