

## 耐热 $\alpha$ -淀粉酶的筛选、基因克隆和酶学性质分析\*

# Screening of Thermostable $\alpha$ -Amylase Producing Strain and Cloning, Expression and Characterization of the Gene *AmyGX*

廖思明<sup>1,2</sup>, 孙 靓<sup>1,2</sup>, 王青艳<sup>2</sup>, 申乃坤<sup>2</sup>, 朱 婧<sup>2</sup>, 黄桂媛<sup>2</sup>, 黄纪民<sup>2</sup>, 陈 东<sup>2</sup>, 黄日波<sup>1,2\*\*</sup>

LIAO Siming<sup>1,2</sup>, SUN Liang<sup>1,2</sup>, WANG Qingyan<sup>2</sup>, SHEN Naikun<sup>2</sup>, ZHU Jing<sup>2</sup>, HUANG Guiyuan<sup>2</sup>, HUANG Jimin<sup>2</sup>, CHEN Dong<sup>2</sup>, HUANG Ribo<sup>1,2</sup>

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007) (1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:**【目的】筛选耐热  $\alpha$ -淀粉酶并实现异源表达, 同时分析其酶学性质特征。【方法】以 M9 培养基加上可溶性淀粉作为选择性分离培养基, 从腾冲火山温泉土壤中筛选到产淀粉酶的菌株 *Anoxybacillus* sp. GXS-3。根据淀粉酶氨基酸保守序列, 设计引物进行 PCR 扩增, 然后对目标序列进行步移扩增, 获得淀粉酶基因 *AmyGX*。将 *AmyGX* 与表达载体 pQE30 连接, 导入大肠杆菌 M15 中表达, 对重组酶进行分离纯化和酶学性质分析。【结果】*AmyGX* 基因长 1 515 bp, 编码 505 个氨基酸残基, 前 23 个氨基酸残基为信号肽序列; 重组质粒 pQE30-*AmyGX* 编码的蛋白分子量为 58.04 kDa, 对可溶性淀粉催化水解反应的最适温度为 60℃, 最适 pH 值为 8.0,  $V_{max}$ 、 $K_m$  值分别为 0.19 U/mg、3.14 mg/mL, 热半失活温度  $T_{50}^{30}$  值为 65.2℃;  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$  对该酶具有明显的抑制作用,  $Na^+$ 、 $K^+$  对该酶有激活作用,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  的影响则不明显。【结论】*AmyGX* 是一种中等耐温碱性酶, 在造纸、洗涤剂生产和有毒废弃物去除等方面具有潜在的应用前景。

**关键词:** *Anoxybacillus* sp. GXS-3 菌株 重组淀粉酶 *AmyGX* 克隆与表达 酶学性质

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2017)01-0092-08

**Abstract:**【Objective】Screening thermostable  $\alpha$ -amylase and expressed in *Escherichia coli*, and analyzing the recombinant enzyme characterization. 【Methods】The strain *Anoxybacillus* sp.

GXS-3 is isolated from soil samples collected from Tengchong hot spring, with M9 medium and soluble starch as the sole carbon source. According to the amino acid conserved sequence of amylase, degenerate primers are designed for PCR amplification, and then the target sequence is amplified and amplified to obtain the amylase gene *AmyGX*. *AmyGX* is ligated with the expression vector pQE30, introduced into *E. coli*

收稿日期:2017-02-08

作者简介:廖思明(1969—),女,副研究员,主要从事微生物和分子酶学研究,E-mail:18978916636@qq.com。

\* 国家自然科学基金项目(31560251),广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139053),广西科学与技术开发计划项目(桂科合 15104001-6)和广西科学院基本科研项目(15YJ22SW02)资助。

\*\* 通信作者:黄日波(1958—),男,教授,博士生导师,主要从事微生物与酶学研究,E-mail:rbhuang@gxas.ac.cn。

M15, and the recombinant  $\alpha$ -amylase is isolated and purified by NTA-affinity chromatography and its enzymological properties are analyzed. **【Results】**The gene of *AmyGX* is 1 515 bp in length and encoded a protein of 505 amino acids, of which, the first 23 amino acid residues are signal peptide sequences. The molecular mass of the recombinant *AmyGX* is 58.04 kDa. Assayed with soluble starch as substrate, this recombinant enzyme displays optimal activity at pH 8.0 and 60°C with an apparent  $K_m$  value of 3.14 mg/ml and  $V_{max}$  of 0.19 U/mg respectively. The temperature at which 50% of the enzyme activity is lost after 30 min heat treatment ( $T_{50}^{30}$ ) is 65.2°C.  $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Ba^{2+}$  has significantly inhibitory effect on the activity of the recombinant enzyme, whereas  $Na^+$ 、 $K^+$  could increase the activity and  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  has slightly effect on it. **【Conclusion】***AmyGX* is a moderate enzyme, it could be applied in the field of paper, detergent production and the removal of waste material in environment.

**Key words:** *Anoxybacillus* sp. GXS-3, recombinant  $\alpha$ -amylase *AmyGX*, cloning and expression, enzyme characterization

## 0 引言

**【研究意义】** $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -1,4-糖苷-D-糖苷水解酶, EC 3.2.1.1)是一类对淀粉和其他多聚糖内部的 $\alpha$ -1,4-糖苷键进行随机切割产生不同长度寡糖的酶类<sup>[1]</sup>。淀粉是地球上重要的能源和碳源物质,淀粉酶是仅次于蛋白酶的应用最广泛的酶类之一,占整个酶制剂市场的30%<sup>[2]</sup>。淀粉酶可以从植物、动物和微生物等多样性的生物体中获得。微生物来源的淀粉酶,特别是芽孢杆菌来源的淀粉酶,往往因具有较高的热稳定性而被广泛应用在工业生产上<sup>[3]</sup>。热稳定性高的酶,由于可以耐受较高的反应温度,一方面可以减少反应过程中微生物的污染,另一方面通过降低反应底物的粘度,可增加底物和产物的溶解度、提高底物产物的扩散系数,进而提高反应速率,增加产物得率等<sup>[4]</sup>。此外,耐热酶有助于人们认识蛋白质对高热环境的适应特征和耐热机理,在蛋白质工程中具有重要作用。**【前人研究进展】**嗜热环境中的微生物,具有与高温生境相适应的细胞组分和代谢产物,是耐热酶的主要天然来源<sup>[5]</sup>。耐热 $\alpha$ -淀粉酶的产生菌主要有 *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus globisporus* 和 *Bacillus alvei* 等<sup>[6]</sup>。*Anoxybacillus* sp. 主要分布于地热火山温泉、堆肥等嗜热生境中,适宜生长温度为45~65°C, pH值为6~10,属于中等嗜热碱性菌<sup>[7]</sup>,最早由Heinen等<sup>[8]</sup>在新西兰北部的温泉中发现,命名为 *Bacillus flavothermus*, 2000年时 *Anoxybacillus* 首次作为新的种属报道<sup>[9]</sup>。近年来, *Anoxybacillus* sp. 作为耐热葡萄糖异构酶、耐热核酮糖激酶、耐热木糖酶等的产生菌被陆续发现和报

道<sup>[10-12]</sup>。**【本研究切入点】**相对于其它已进行了大量研究的 $\alpha$ -淀粉酶,来源于 *Anoxybacillus* sp. 的 $\alpha$ -淀粉酶的研究仍很有限。**【拟解决的关键问题】**从云南腾冲火山温泉土壤中分离筛选产耐热 $\alpha$ -淀粉酶的 *Anoxybacillus* sp. 菌株,并从中克隆耐热 $\alpha$ -淀粉酶基因,然后在大肠杆菌中进行异源表达,最后对该重组酶进行酶学性质分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 土样、菌株及质粒

土样:采集自云南腾冲火山温泉土壤。

菌株及质粒:大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自 Invitrogen 公司,大肠杆菌 M15、质粒 pQE30 购自 Qiagen 公司。

#### 1.1.2 培养基及碘液配方

富集培养基:蛋白胨(1%)、淀粉(0.1%)、 $Na_2HPO_4$ (25 mmol/L)、 $KH_2PO_4$ (25 mmol/L)、 $NH_4Cl$ (25 mmol/L)、 $MgSO_4$ (2 mmol/L)。

淀粉酶筛选培养基:M9培养基加上可溶性淀粉(0.1%)。

鲁格氏碘液(300 mL):1 g  $I_2$ , 2 g KI。

#### 1.1.3 酶、试剂及主要仪器设备

实验所用到的各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、ExTaq 酶、LA 酶、pMD18T-Vector 克隆试剂盒、基因组步移试剂盒等购自 Takara 公司,基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒等购自 Tiangen 公司,蛋白纯化用 Ni-NTA 购自 Qiagen 公司,脱盐柱 HiTrap Desalting G-25、阴离子柱 Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance、分子筛柱 Superdex<sup>TM</sup> 75 10/300GL 等购自 GE 公司,引物由上海生工生物工程公司合成,其它试剂均为化

学分析纯。梯度 PCR 仪为 Biometra 公司的 TProfessional Thermocycler, 凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel Doc™ XR+, 蛋白层析仪为 GE 公司的 ÄKTA purifier, 核酸蛋白分析仪为 ThermoFisher 公司的 NanoDrop 2000c Spectrophotometer。

## 1.2 耐热 $\alpha$ -淀粉酶产生菌的分离和鉴定

称取自然风干土样 1 g 加入 100 mL 富集培养基, 37°C、220 r/min 培养 24 h, 取 1 mL 培养液, 以无菌生理盐水为稀释液, 进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  的连续梯度稀释, 涂布于淀粉酶筛选固体平板, 置于恒温培养箱 60°C 培养 48~72 h, 待平板长出 1 mm 左右大小的菌落后, 在平板表面滴加鲁格氏碘液, 挑选水解圈明显的菌株进行菌种鉴定。菌株基因组 DNA 的提取按试剂盒说明书操作, 选取原核生物 16S rDNA 的通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGTATC-CTGGCTCA-3', 1492R: 5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3', 用 ExTaq 酶进行 PCR 扩增, 扩增产物经凝胶回收并纯化, 将纯化产物与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取转化子进行菌体电泳后, 挑选验证正确的转化子送上海生工生物工程公司测序。根据测序结果从 NCBI 数据库中选择近缘菌株的 16S rDNA 基因序列, 采用 Clustal Omega(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)<sup>[13]</sup> 进行多序列比对分析和系统进化树构建, 以确定该菌株的分类地位。

## 1.3 耐热 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆

### 1.3.1 基因序列比较和蛋白质分析

使用 NCBI 的 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行基因序列比对, ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 进行基因开放阅读框预测, BPROM 程序(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)<sup>[14]</sup> 用于启动子区预测, CAZY 数据库(<http://www.cazy.org>)<sup>[15]</sup> 进行糖苷水解酶分类分析和检索, SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)<sup>[16]</sup> 进行蛋白质结构组件分析, SignalP 4.1(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)<sup>[17]</sup> 用于信号肽预测, 使用 Primer premier 5.0 软件进行引物设计。

### 1.3.2 $\alpha$ -淀粉酶基因克隆

以 *Anoxybacillus flavithermus* WK1 的基因座位“Aflv\_2188”的 Amylase 序列为参照, 对淀粉酶氨基酸序列 BLAST 分析, 选取保守区域进行引物设计, 正向引物 Amy-F: 5'-ATGGTCGACCGKT-TYAA-3', 反向引物 Amy-R: 5'-AAAATCRC-CGCGMCGMARVGA-3' (K = T/G, Y = C/T, R =

A/G, M = A/C, V = A/G/C), 按基因组步移试剂盒的说明进行基因步移扩增, 获得淀粉酶完整编码基因序列。通过 SignalP 4.1 Server, 对该淀粉酶序列进行信号肽预测分析。设计引物 AmyGX-F: 5'-ATC GGATCCAAAACGGAGCGAGCGTGGC-3' 和 AmyGX-R: 5'-AGC CTGCAGTCAGAGATTT-GATGCTTTCG-3', 分别在上下游引物的 5' 端引入 BamHI 和 Pst I 酶切位点(下划线部分), 扩增去除信号肽序列的结构域部分, 凝胶回收目的 PCR 产物, 并进行 BamHI 和 Pst I 酶切后, 与经相同限制性内切酶酶切的表达载体 pQE30 连接, 连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 重组质粒命名为 pQE30-AmyGX, 酶切鉴定重组质粒并测序验证。

## 1.4 $\alpha$ -淀粉酶的表达和纯化

将测序验证正确的重组质粒转化大肠杆菌表达宿主 M15, 然后转接到含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄霉素和 25  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 置 37°C、220 r/min 摇床培养, 当  $OD_{600}$  达到 0.5~0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 在 20°C 下培养 16 h, 离心收集菌体, 磷酸缓冲液洗涤菌体, 以含 10 mmol/L 咪唑、1 mmol/L PMSF 的磷酸缓冲液悬浮菌体后进行超声破碎。对表达的重组蛋白进行过 Ni-NTA 柱、阴离子柱 Hiload 16/10 Q Sepharose High Performance、分子筛柱 Superdex™ 75 10/300GL 的纯化和置换缓冲液, 纯化后的蛋白保存在 pH 值为 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中, SDS-PAGE 检测其纯度。

## 1.5 $\alpha$ -淀粉酶的活性分析

酶活力分析采用二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[18]</sup>, 在相应的温度、pH 值条件下, 以 490  $\mu$ L 1% 淀粉溶液为底物, 加入 10  $\mu$ L 适当稀释的淀粉酶液, 反应 10 min, 加入 500  $\mu$ L DNS 液终止反应, 沸水浴中反应 10 min, 测定  $OD_{540}$  吸收值, 以麦芽糖的 DNS 显色  $OD_{540}$  吸收值绘制标准曲线进行标定。所有分析进行 3 个平行实验测定。

酶活力单位定义: 在最适反应 pH 值和最适反应温度条件下, 每毫升反应体系中每分钟水解可溶性淀粉产生 1  $\mu$ mol 麦芽糖所需的酶量为 1 活力单位(U)。

## 1.6 $\alpha$ -淀粉酶的酶学性质研究

### 1.6.1 最适反应 pH 值和最适反应温度的测定

配置 pH 值为 4.5~10.5(梯度为 0.5)的一系列缓冲液, 其中, pH 值为 4.5~5.5 时采用乙酸-乙酸钠缓冲液(0.1 mol/L)、pH 值为 6.0~7.0 时采用磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液(0.1 mol/L)、pH 值在

7.5~8.5 时采用 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol/L)、pH 值为 9.0~10.5 时采用甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(0.1 mol/L),在 60℃ 反应 10 min,以最高酶活力为 100% 计算相对酶活,绘制 pH 值-相对活力曲线,确定最适反应 pH 值。

在最适 pH 值条件下,进行 40~75℃ 温度范围内的反应 10 min,以最高酶活力为 100% 计算相对酶活,绘制温度-相对活力曲线,确定最适反应温度。

### 1.6.2 动力学常数测定

在最适反应温度和最适反应 pH 值条件下,测定 1 μg 重组 α-淀粉酶在一系列淀粉浓度(1.00 mg/mL、1.25 mg/mL、2.00 mg/mL、2.50 mg/mL、4.00 mg/mL、6.00 mg/mL、8.00 mg/mL、10.0 mg/mL)条件下的表观催化速率,绘制 1/V -1/[S] 双倒数曲线。

### 1.6.3 酶热稳定性的测定

在梯度 PCR 仪上,取 0.1 mg/mL 的重组淀粉酶在一系列温度(56.0℃、58.0℃、60.0℃、62.0℃、64.0℃、66.0℃、68.0℃、70.0℃)上热激 30 min,然后在最适反应温度和 pH 值条件下检测残余酶活力,

分析重组淀粉酶的热半失活温度  $T_{50}$  值,以未经温度处理的酶的活力为 100%。

### 1.6.4 金属离子对重组淀粉酶的影响

在反应体系中,加入终浓度为 5 mmol/L 的金属离子  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ ,在最适反应温度和 pH 值条件下,测定金属离子对重组淀粉酶 AmyGX 活性的影响,以不添加金属离子的酶的活力为 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 产耐热 α-淀粉酶菌株的鉴定

以 M9 培养基加上可溶性淀粉为唯一碳源的筛选培养基,共分离获得 6 株具明显降解可溶性淀粉的菌株,挑选其中透明圈直径(H)与菌落直径(C)比值(H/C)大的菌株作进一步的分析。

提取该菌株的基因组 DNA,PCR 反应扩增得到约 1.5 kb 的 DNA 片段,测序后,经序列比对、系统进化树分析(图 1),确定该菌株为厚壁菌门的厌氧芽胞杆菌属菌株,将其命名为 *Anoxybacillus* sp. GXS-3(GenBank Accession No. JF831203)。

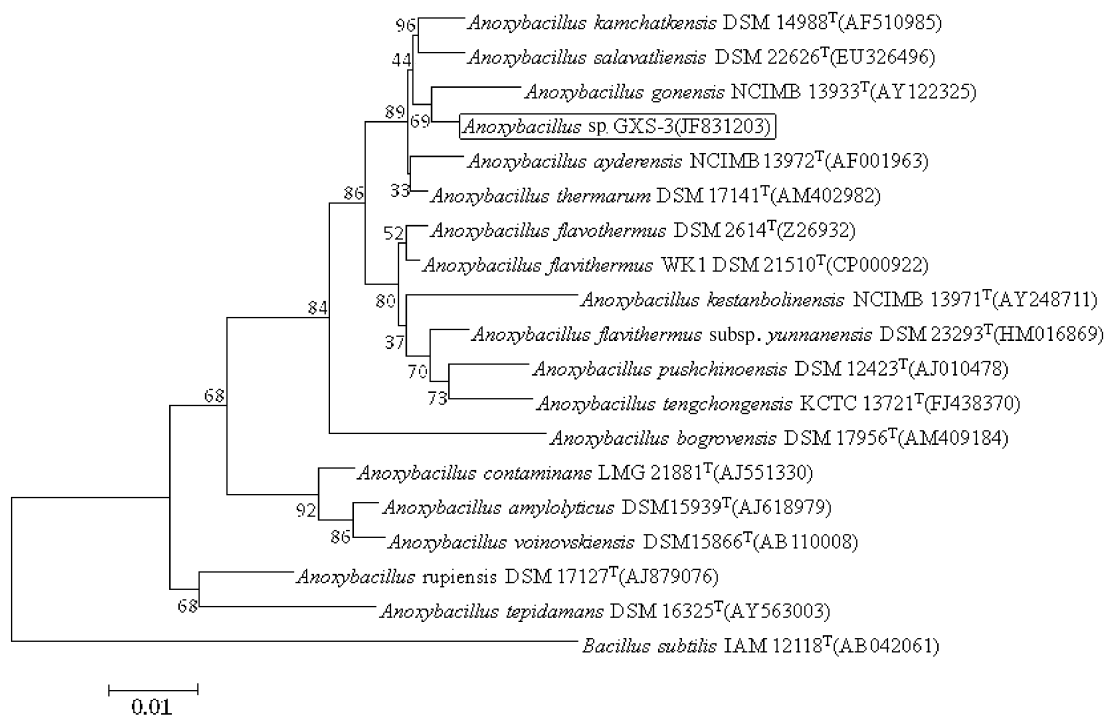


图 1 菌株 *Anoxybacillus* sp. GXS-3 的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequences showing the position of strain *Anoxybacillus* sp. GXS-3 among *Anoxybacillus* cluster. *Bacillus subtilis* is out-group. Bar indicates 0.01 nucleotide substitution per position



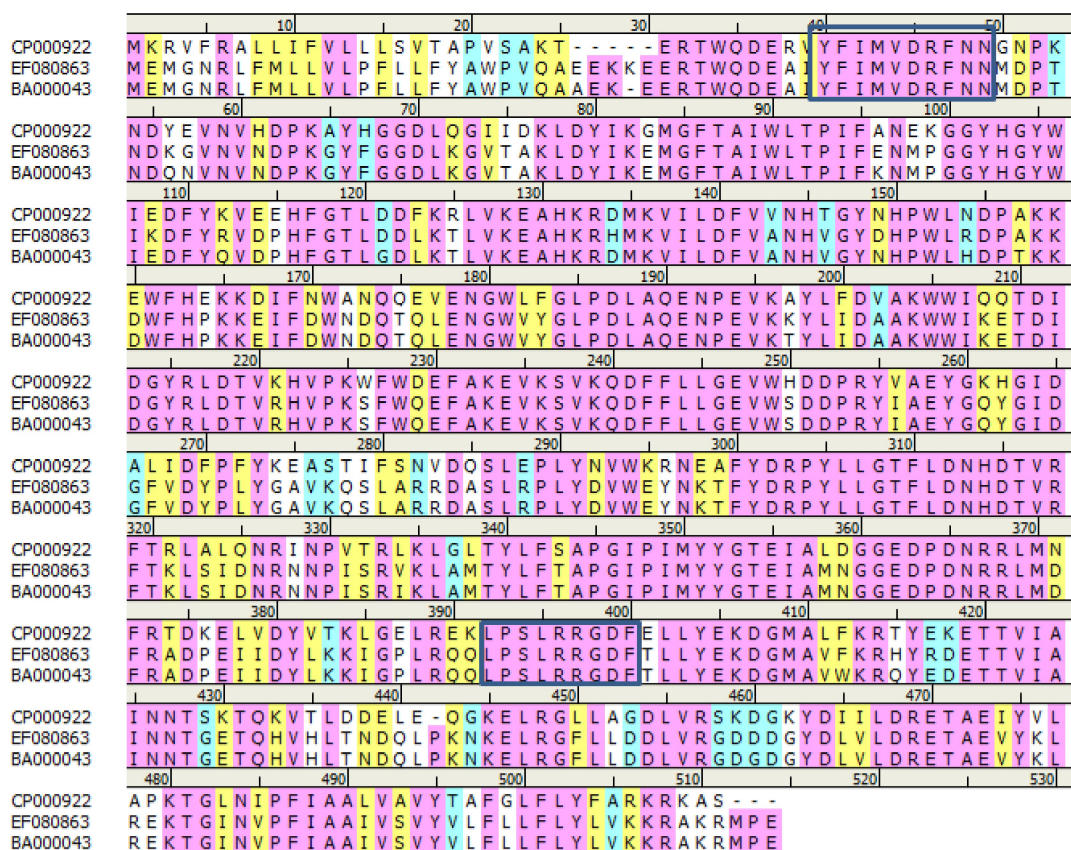
## 2.2 $\alpha$ -淀粉酶基因的克隆和生物信息学分析

以 *Anoxybacillus* sp. GXS-3 的 16S rDNA 序列在 NCBI 数据库中进行搜索比对分析,发现与其序列一致性达 99% 的好热黄无氧芽胞杆菌 *Anoxybacillus flavithermus* WK1 已完成了全基因组测序 (GenBank Accession No. CP000922)<sup>[19]</sup>,基因组注释显示 *Anoxybacillus flavithermus* WK1 编码一个  $\alpha$ -淀粉酶,基因座位为“Aflv\_2188”,以此序列为参照进行氨基酸序列的 BLAST 分析(图 2)。根据 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 (GenBank Accession No. BA000043), *Geobacillus* sp. POT5 (GenBank Accession No. EF080863) 和 *Anoxybacillus flavithermus* WK1 的淀粉酶保守序列 YFIM-VDRFNN、LPSLRRGDF, 设计简并引物对 *Anoxybacillus* sp. GXS-3 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,得到的 DNA 片段约 1.1 kb,测序分析。按照基因组步移试剂盒的说明,对目标序列进行两端步移扩增。对扩增后的基因序列进行启动子区、开放阅读

框的分析,获得具有完整编码序列的  $\alpha$ -淀粉酶基因 (GenBank Accession No. JF946749),该基因编码 505 个氨基酸,与 Aflv\_2188 的一致性为 92%,命名为 AmyGX。使用 CAZY 数据库进行检索,AmyGX 属于糖苷水解酶类的第 13 家族 (GH13);使用 SMART 工具分析蛋白质的结构组件,AmyGX 的 N 端第 13~361 位氨基酸为  $\alpha$ -淀粉酶家族结构域;使用 SignalP 4.1 分析信号肽序列,显示 AmyGX 在第 23 与 24 位氨基酸为信号肽酶切割位点。

## 2.3 重组酶 AmyGX 的诱导表达及纯化

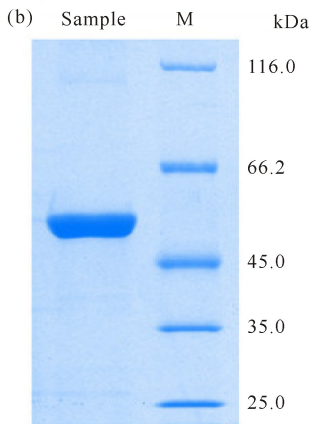
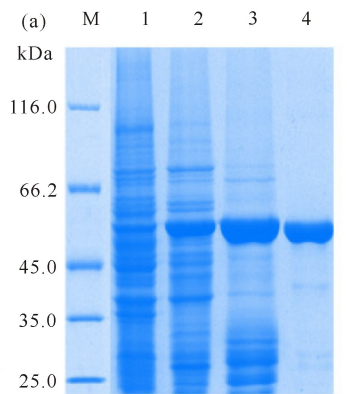
经 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 分析,含有重组质粒 pQE30-AmyGX 的大肠杆菌菌株 M15 与对照菌株相比,在约 58 kDa 处有明显蛋白质特征条带出现,蛋白分子量与由基因序列推测所得理论分子量一致;经 Ni-NTA 亲和层析、阴离子柱、分子筛柱分离纯化,获得纯度大于 90% 的重组蛋白 AmyGX,用于酶学性质分析(图 3)。



Red; Identical; Orange; Strong similarity; Blue; Weak similarity; White; Non-matching

图 2  $\alpha$ -淀粉酶氨基酸序列的比对

Fig. 2 Alignment of putative  $\alpha$ -amylase sequences from the strain *Anoxybacillus flavithermus* WK1, *Geobacillus* sp. POT5 and *Geobacillus kaustophilus* HTA426



M: Molecular weight markers; 1: Crude extract of *E. coli* M15 cells before induction; 2: Crude extract of *E. coli* M15 cells, 16 h after IPTG induction; 3: Purified recombinant AmyGX after Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography; 4: Purified recombinant AmyGX after ion-exchange chromatography. Sample: Purified recombinant AmyGX after size-exclusion chromatography

图3 重组 $\alpha$ -淀粉酶 AmyGX 的纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant AmyGX

## 2.4 重组酶 AmyGX 的酶活性质分析

### 2.4.1 重组酶 AmyGX 的最适反应 pH 值和温度

如图 4 所示,重组酶 AmyGX 的最适反应 pH 值为 8.0,当 pH 值为 6.0~9.5 时,酶活力在 70% 以上,表明重组酶 AmyGX 是一个偏碱性的  $\alpha$ -淀粉酶。在最适反应 pH 值条件下,重组酶 AmyGX 的最适反应温度为 60℃,当温度为 55~65℃ 时,酶活力在 85% 以上(图 5)。

### 2.4.2 重组酶 AmyGX 的动力学常数分析

如图 6 所示,根据重组酶 AmyGX 在不同浓度底物下的双倒数曲线,通过米氏方程计算出重组酶 AmyGX 的  $V_{max}$ 、 $K_m$  值分别为 0.19 U/mg、3.14 mg/mL。

### 2.4.3 重组酶 AmyGX 的热稳定性分析

如图 7 所示,重组酶 AmyGX 的  $T_{50}^{30}$  值为

65.2℃。当温度为 56~62℃ 时,其酶活力没有明显变化,属于中等耐温酶。

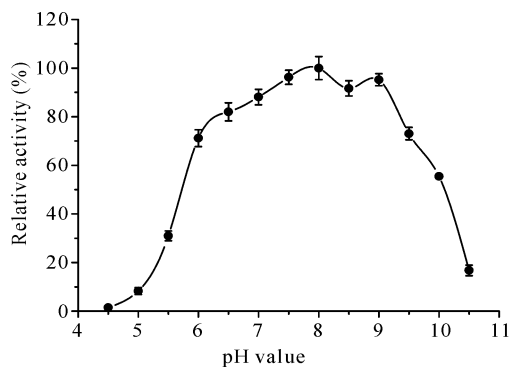


图4 pH 值对重组酶 AmyGX 活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on recombinant AmyGX activity

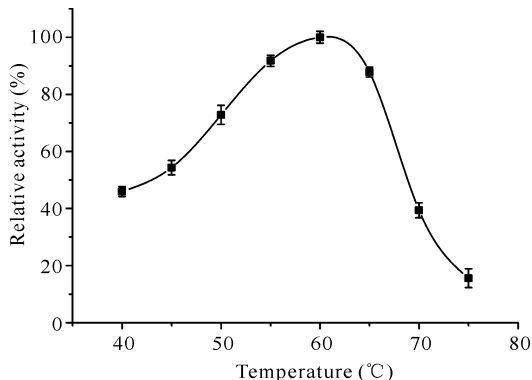


图5 温度对重组酶 AmyGX 活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on recombinant AmyGX activity

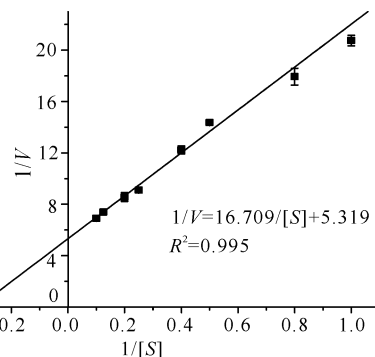


图6 重组酶 AmyGX 的双倒数曲线

Fig. 6 Lineweaver-Burk plot of recombinant AmyGX

### 2.4.4 金属离子对重组酶 AmyGX 的影响

如表 1 所示,Zn<sup>2+</sup> 完全抑制重组酶 AmyGX 的活性;Cu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup> 对重组酶 AmyGX 具有强烈的抑制作用,相对酶活力分别下降到 1.12%、27.59%、37.99%;Ba<sup>2+</sup> 对重组酶 AmyGX 具有明显的抑制作用;Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 对重组酶 AmyGX 的活力影响不明显;Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup> 则对重组淀粉酶 AmyGX 有激活作用,相对酶活力分别提高到 129%、115%。

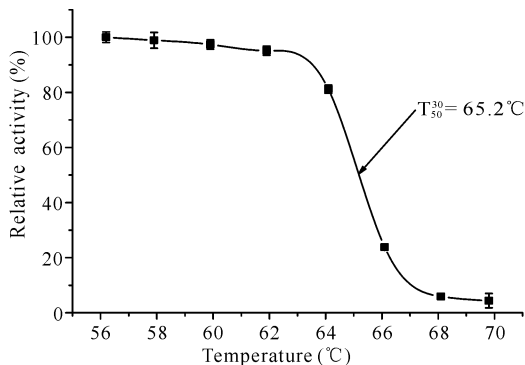


图7 重组酶 AmyGX 的热稳定性分析

Fig. 7 Thermostability of recombinant AmyGX

表1 金属离子对重组淀粉酶 AmyGX 活性的影响

Table 1 Effect of metal ions(5 mmol/L) on the activity of recombinant AmyGX

Metal ions	Relative activity (%)
Na <sup>+</sup>	129.89±0.37
K <sup>+</sup>	113.28±0.82
Ca <sup>2+</sup>	99.69±3.06
Mg <sup>2+</sup>	95.91±2.84
Ba <sup>2+</sup>	74.11±2.01
Fe <sup>3+</sup>	37.99±1.59
Co <sup>2+</sup>	27.59±2.14
Cu <sup>2+</sup>	1.12±0.67
Zn <sup>2+</sup>	0.00
Control	100.00±6.17

### 3 讨论

*Anoxybacillus* 最初是被作为一种新的厌氧芽孢杆菌属报道<sup>[9]</sup>, 随后, 兼性厌氧、需氧的 *Anoxybacillus* 菌株相继被发现<sup>[20]</sup>, 目前, 属于 *Anoxybacillus* 的有 22 个种和 2 个亚种被命名 (<http://www.bacterio.net>)。我们从腾冲火山温泉的土壤中, 经筛选培养基分离、16S rDNA 鉴定, 获得生长温度为 60°C 的产 α-淀粉酶的中等耐热菌株 *Anoxybacillus* sp. GXS-3。从进化树的结果分析, 与 *Anoxybacillus* sp. GXS-3 进化关系最近的为 *Anoxybacillus gonensis* NCIMB 13933<sup>T</sup>, 其次为 *Anoxybacillus kamchatkensis* DSM 22626<sup>T</sup> 和 *Anoxybacillus salavatliensis* DSM 14988<sup>T</sup>, 与同是来源于腾冲温泉的 *Anoxybacillus tengchongensis* KCTC 1372<sup>T</sup>、*Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* DSM23293<sup>T</sup> 尚有一定的进化距离。腾冲火山温泉中蕴藏着丰富的嗜热菌资源, 尚待进一步的挖掘。

与来源于嗜热生境中的耐热 α-淀粉酶往往需要 Ca<sup>2+</sup> 来维持其稳定的构象不同, Ca<sup>2+</sup> 对重组淀粉酶 AmyGX 的酶活力影响不明显, 这与 Kikani 等<sup>[21]</sup> 对

来源于 *Anoxybacillus beppuensis* 的 α-淀粉酶的描述相一致。Zn<sup>2+</sup> 能完全抑制重组酶 AmyGX 的活性, 表明该酶的活性中心存在含巯基或羧基的关键氨基酸残基<sup>[22]</sup>。我们根据淀粉酶的两端保守序列 YFIMVDRFNN、LPSLRRGDF, 采用步移法从 *Anoxybacillus* sp. GXS-3 中克隆出 α-淀粉酶基因 AmyGX 并在大肠杆菌中表达。该 α-淀粉酶的氨基酸序列与来源于 *Geobacillus thermoleovorans* 的 α-淀粉酶 4E2O 的一致性最大, 为 72%; 其次与来源于 *Thermus* sp. IM 6501 的 α-淀粉酶 1SMA 的一致性为 31%; 与目前工业上广泛应用的嗜热脂肪芽孢杆菌 α-淀粉酶 (*Bacillus stearothermophilus* α-amylase, BAA)<sup>[23]</sup> 和地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶 (*Bacillus licheniformis* α-amylase, BLA)<sup>[24]</sup> 等的一致性低于 20%。是一类结构新颖的淀粉酶, 我们将对该酶开展结构与功能关系的后续相关研究。

### 4 结论

α-淀粉酶基因 AmyGX 全长 1 515 bp, 编码 505 个氨基酸, 属于糖苷水解酶 13 家族 (GH13), 具有淀粉酶的 7 个保守氨基酸序列区域 (CSR)。重组酶 AmyGX 的最适反应温度为 60°C, 最适反应 pH 值为 8.0, T<sub>30</sub> 值为约 65.2°C, 在 pH 值为 6.0~9.5 的范围内具有较稳定的酶活力, 为中等耐温碱性酶, 在造纸、纺织品、洗涤剂生产、有毒废弃物去除和环境金属离子监测等方面具有潜在的应用。

#### 参考文献:

- [1] MACGREGOR E A. α-Amylase structure and activity [J]. Journal of Protein Chemistry, 1988, 7(4): 399-415.
- [2] AZAD M A K, BAE J H, KIM J S, et al. Isolation and characterization of a novel thermostable α-amylase from Korean pine seeds [J]. New Biotechnology, 2009, 26(3/4): 143-149.
- [3] BURHAN A, NISA U, GÖKHAN C, et al. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6 [J]. Process Biochemistry, 2003, 38(10): 1397-1403.
- [4] VAN DER MAAREL M, 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.
- [5] ZEIKUS J G, VIEILLE C, SAVCHENKO A. Thermozymes: Biotechnology and structure-function relationships [J]. Extremophiles, 1998, 2(3): 179-183.
- [6] AGÜLOGLU S, ENSARI N Y, UYAR F, et al. The

- effects of amino acids on production and transport of  $\alpha$ -amylase through bacterial membranes [J]. *Starch - Stärke*, 2000, 52(8/9):290-295.
- [7] GOH K M, KAHAR U M, CHAI Y Y, et al. Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(4):1475-1488.
- [8] HEINEN W, LAUWERS A M, MULDER J W. *Bacillus flavothermus*, a newly isolated facultative thermophile[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1982, 48(3):265-272.
- [9] PIKUTA E, LYSENKO A, CHUVILSKAYA N, et al. *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus falvitherms* comb. nov.[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(6):2109-2117.
- [10] KARA OGLU H, YANMIS D, SAL F A, et al. Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2<sup>T</sup> that displays a high level of activity and thermal stability[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 97:215-224.
- [11] TOKGÖZ M, BEKTAS K I, BELDUZ A O, et al. Cloning, purification, and characterization of a thermophilic ribulokinase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari[J]. *Molecular Biology*, 2014, 38(38):633-639.
- [12] XU J Y, REN F F, HUANG C H, et al. Functional and structural studies of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11 [J]. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, 2014, 82(9):1685-1693.
- [13] MCWILLIAM H, LI W Z, ULUDAG M, et al. Analysis tool web services from the EMBL-EBI [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(W1):W597-W600.
- [14] BUSBY S, EBRIGHT R H. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes[J]. *Cell*, 1994, 79(5):743-746.
- [15] LOMBARD V, RAMULU H G, DRULA E, et al. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1):D490-D495.
- [16] LETUNIC I, DOERKS T, BORK P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2015 [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1):D257-D260.
- [17] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, et al. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. *Nature Methods*, 2011, 8(10):785-786.
- [18] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3):426-428.
- [19] SAW J H, MOUNTAIN B W, FENG L, et al. Encapsulated in silica: Genome, proteome and physiology of the thermophilic bacterium *Anoxybacillus flavithermus* WK1 [J]. *Genome Biology*, 2008, 9:R161.
- [20] PIKUTA E, CLELAND D, TANG J. Aerobic growth of *Anoxybacillus pushchinoensis* K1<sup>T</sup>: Emended descriptions of *A. pushchinoensis* and the genus *Anoxybacillus* [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(5):1561-1562.
- [21] KIKANI B A, SINGH S P. The stability and thermodynamic parameters of a very thermostable and calcium-independent  $\alpha$ -amylase from a newly isolated bacterium, *Anoxybacillus beppuensis* TSSC-1 [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12):1791-1798.
- [22] CHAI Y Y, RAHMAN R N Z R A, ILLIAS R M, et al. Cloning and characterization of two new thermostable and alkali-tolerant  $\alpha$ -amylases from the *Anoxybacillus* species that produce high levels of maltose [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(5):731-741.
- [23] ALIKHAJEH J, KHAJEH K, RANJBAR B, et al. Structure of *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase at high resolution: Implications for thermal stability [J]. *Acta Crystallographica F: Structural Biology and Crystallography Communications*, 2010, 66:121-129.
- [24] DECLERCK N, MACHIUS M, CHAMBERT R, et al. Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase: Thermodynamic studies and structural interpretation [J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 1997, 10(5):541-549.

(责任编辑:陆雁)