

文章编号: 1009-038X(2004)04-0094-04

大肠杆菌生产重组极耐热木聚糖酶的 诱导条件及其酶学性质

裴建军¹, 李迅², 李相前², 邵蔚蓝^{1, 2*}

(1. 南京师范大学生命科学院, 江苏南京 210097 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏无锡 214036)

摘要: 构建重组菌(JM109/pTrc-99A-xylIV)作为极耐热木聚糖酶的生产菌株, 研究了IPTG诱导时间、IPTG浓度、重组菌生长的不同阶段加IPTG和温度对重组菌生产极耐热木聚糖酶的影响以及它的酶学性质。结果表明, IPTG诱导8h后极耐热木聚糖酶的表达量基本维持不变。0.5~5 mmol/L浓度的IPTG诱导重组菌表达极耐热木聚糖酶的效果基本相同; 当重组菌生长到OD₆₀₀为1.2左右时加IPTG诱导最好, 诱导温度对极耐热木聚糖酶表达水平的影响不大。重组耐热木聚糖酶的最适反应pH值为5.4~5.8, 重组极耐热木聚糖酶的最适反应温度大于100℃, 重组极耐热木聚糖酶在pH值4.2~7.5都比较稳定, 重组极耐热木聚糖酶的温度稳定性好, 在90℃下保温2h后残存酶活还有90%。

关键词: 重组菌; 极耐热木聚糖酶; 诱导

中图分类号: Q556.2

文献标识码: A

Inducement Condition of Re-Combinated Thermostable Xylanase Expressed in *E. coli*

PEI Jian-jun¹, LI Xun², LI Xiang-qian², SHAO Wei-lan^{1, 2*}

(1. School of life science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Several factors influencing thermostable xylanase production with Re-combination *E. coli* (JM109/pTrc-99A-xylIV) were investigated. The results showed that the production of thermostable xylanase did not improve after 8 hours of IPTG induction. Concentrations of IPTG from 0.5 to 5 mmol/L had the same effect on expression of thermostable xylanase. The best induced time was OD₆₀₀ at about 1.2. The temperature from 30℃ to 37℃ did not affect the production of thermostable xylanase. The optimal reaction conditions for the thermostable xylanase were pH 5.5~5.8 at 100℃. The thermostable xylanase was stable at pH range of 4.2~7.2. 90% of the enzyme remained when activity incubating at 90℃ for 2 hours.

Key words: re-combination *E. coli*; thermostable xylanase; induction

收稿日期 2003-09-27; 修回日期 2003-11-24.

基金项目: 国家轻工总局211专项基金; 无锡市自然科学基金资助项目.

作者简介: 裴建军(1977-), 男, 江苏宜兴人, 工学硕士; * 通讯作者.

随着人口的不断增长和资源的进一步消耗,可再生资源的开发利用已经成为世界性共同关注的问题.木质纤维,如秸秆、碎木等作为一种丰富而又尚未开发的重要资源越来越受到重视. β -1,4-木聚糖内切酶(1,4- β -木聚糖木糖水解酶 EC3.2.1.8),简称木聚糖酶,水解木聚糖主干链内部的 1,4-糖苷键,多数作用于木聚糖的无侧枝区段,产生低聚糖或带有侧枝的寡聚糖.木聚糖是半纤维素的主要部分,因此,木聚糖酶是木聚糖降解过程中最关键的一个酶^[1].而热袍菌属的海栖热袍菌所产生的木聚糖酶 B 的耐热性非常好,其最适反应温度高达 105 °C^[2],它的耐高温及热稳定性是工业化应用中的理想特征.但是由于它来源于海栖热袍菌,其密码子偏好性与大肠杆菌有差别,所以表达量不高.作者已经通过定向改造和定点突变,大幅度地提高了海栖热袍菌极耐热木聚糖酶 B 在大肠杆菌中的表达量(专利申请号:03131524.0).本实验主要是通过优化诱导条件来进一步提高表达量,并对重组酶的酶学性质进行研究,为以后应用奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和设备 木聚糖(xylan, from birchwood), p-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH) 购于 SIGMA 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp) 购于申能博彩公司.

UV-2000 分光光度计:上海龙尼柯仪器有限公司制造;IEC multiry 高速冷冻离心机:美国 Thermo Life Sciences Limited 公司制造;电转化仪:美国 BIO-RAD Pacific LTD 公司制造.

1.1.2 菌株和质粒 *E. coli* JM109 本实验室保存,重组质粒 pTrc-99A-xylIV 本实验室保存.

1.1.3 培养基 LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 10. 摇瓶培养基(g/L):胰蛋白胨 12, 酵母膏 24, KH_2PO_4 0.231, K_2HPO_4 1.254, 甘油 4 mL/L.

1.2 方法

1.2.1 质粒转化大肠杆菌 将宿主菌 JM109 制成感受态细胞,取 100 μL 与质粒混合,按文献[3,4]的方法进行电转化,然后涂布在含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 °C 培养过夜.

1.2.2 细胞密度测定 取发酵液经适当稀释后,用 UV-2000 分光光度计在 600 nm 处测吸光值.

1.2.3 木聚糖酶的测定 100 μL 质量分数 0.5% 的木聚糖,酶液按 1 μL 和 100 mmol/L pH 5.4 的磷

酸缓冲液 80 μL 反应 5 min 后,加 600 μL 终止剂.显色剂 PAHBAH [配方为:V(0.5 mol/L NaOH):V(溶于 0.5 mol/L HCl 的质量分数为 5% PAHBAH)=4:1] 煮沸 10 min,冷却后测 $A_{410\text{nm}}$ 值^[5].

酶单位(U)的定义:在该反应条件下,1 min 内催化产生 1 μmol 产物所需的酶量.

1.2.4 酶性质的测定

1) 最适反应温度:在 65 ~ 100 °C 范围内,每隔 5 °C,分别测定酶活.以酶活最高为 100% 计算相对酶活.

2) 最适反应 pH 值:在不同的 pH 值条件下分别测定酶活,以酶活最高为 100%,计算相对活性.反应所用的缓冲液是 0.1 mol/L 咪唑邻苯二甲酸氢钾缓冲液,在常温下的范围是 pH 值 3.8 ~ 8.2,使用时需在 90 °C 下校正,校正后的范围 pH 值为 4.20 ~ 7.52.

3) 温度稳定性:在相对稳定的 pH 值下,使酶在某个温度下保温不同的时间,再测定相对酶活,以未保温(4 °C 保存)的酶样活性为 100%,由此确定酶的稳定性.

4) pH 值稳定性:酶在不同的 pH 值条件下保温相同的时间,再分别测定残留酶活性与不保温的酶活比,计算百分比.缓冲液的选择参见 1.2.4.2).

2 结果

2.1 重组菌的生长曲线

重组菌(JM109/pTrc-99A-xylIV)生长条件定为,100 mL 三角瓶装液 30 mL,37 °C,220 r/min 振荡培养.生长曲线见图 1.由图可看出,重组菌生长至 7 h,菌数可达到最高.

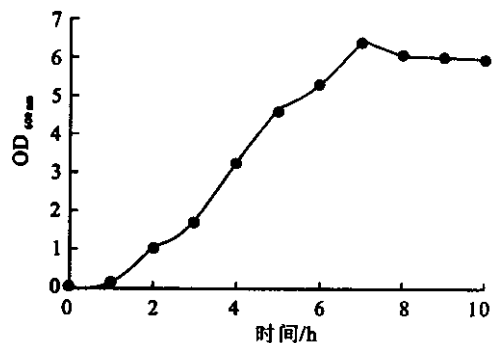


图 1 重组菌的生长曲线

Fig.1 Re-combination *E. coli* (pTrc-99A-xylIV) growth curve

2.2 IPTG 诱导时间对重组木聚糖酶表达水平的影响

重组菌在菌数达到 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG (

终浓度为 5 mmol/L) 诱导,每隔 1 h 取样,以测定每毫升菌液木聚糖酶酶活来分析重组木聚糖酶的表达情况(见图 2)。结果表明,诱导 8 h 后重组木聚糖酶的表达量基本维持不变,因此诱导可在 8 h 左右结束。

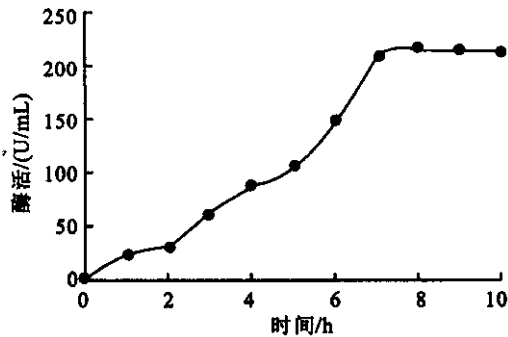


图 2 IPTG 诱导时间对木聚糖酶表达水平的影响

Fig. 2 Effect of IPTG induction duration on xylanase expression

2.3 IPTG 浓度对重组木聚糖酶表达水平的影响

重组菌在三角瓶摇瓶培养至 OD_{600} 为 0.6 时,分别加入不同量的 IPTG,终浓度分别为 0.5, 1.5, 3, 5 mmol/L,诱导 9 h 后取样,以测定每毫升菌液木聚糖酶酶活来分析 IPTG 浓度对重组木聚糖酶表达水平的影响。从图 3 可以看出,0.5 ~ 5.0 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导重组菌表达重组木聚糖酶的效果基本相同,5 mmol/L 浓度的 IPTG 比其他浓度诱导的效果略有提高。实验表明,0.5 mmol/L 浓度的 IPTG 足以诱导启动子完全开放而达到较好的诱导效果。

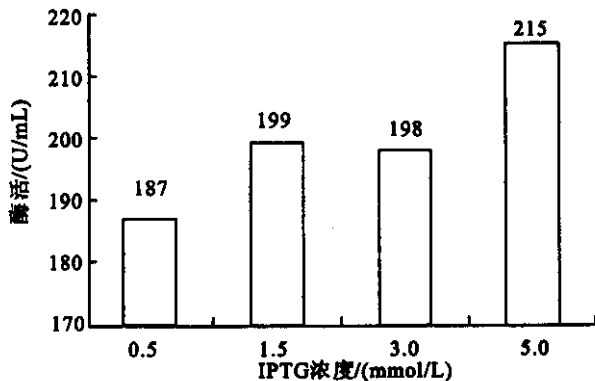


图 3 IPTG 浓度对木聚糖酶表达水平的影响

Fig. 3 Effect of concentration of IPTG on xylanase expression

2.4 重组菌生长的不同阶段加 IPTG 对重组木聚糖酶表达水平的影响

重组菌在达到 OD_{600} 为 0.6, 1.2, 2.4 时分别加入 IPTG(终浓度为 5 mmol/L)诱导,每隔 1 h 取样,以测定每毫升菌液木聚糖酶酶活来分析重组木聚糖酶的表达情况。从图 4 可以看出,在 OD_{600} 为 1.2

左右时加 IPTG 诱导最好,单位体积产生的重组木聚糖酶最多达到 243 U/mL。诱导 7 h 后重组木聚糖酶的表达量基本保持不变。

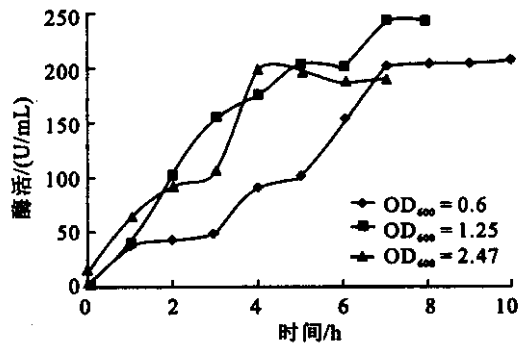


图 4 重组菌生长的不同阶段加 IPTG 对木聚糖酶表达水平的影响

Fig. 4 Effect of different concentration of JM109/pTrc-99A-xylIV with IPTG on xylanase expression

2.5 诱导温度对重组木聚糖酶表达水平的影响

重组菌分别在 30 °C 和 37 °C 培养,菌数达到 OD_{600} 为 1.2 左右时加 IPTG 诱导,诱导 8 h,以测定每毫升菌液木聚糖酶酶活来分析重组木聚糖酶的表达情况。30 °C 培养诱导能够有效地降低本底表达,但实验中 30 °C 和 37 °C 诱导培养对重组木聚糖酶的表达基本没有区别。可以看出,重组木聚糖酶对宿主菌基本没有毒害。

2.6 重组木聚糖酶的最适反应 pH 值

在不同的 pH 值下,其他反应条件相同,测定重组木聚糖酶的酶活。从图 5 可以看出,重组木聚糖酶的最适反应 pH 值在 5.4 ~ 5.8 之间,海栖热袍菌起始的木聚糖酶 B 的最适反应 pH 值是 5.4,两者基本一致。

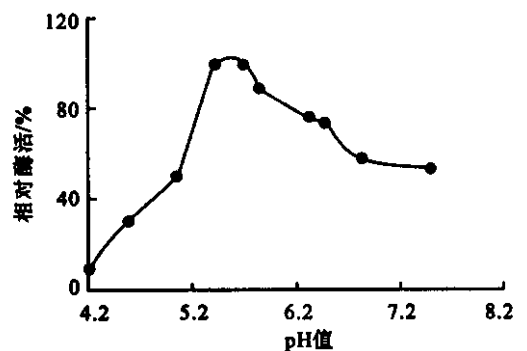


图 5 pH 值对酶活的影响

Fig. 5 Effect of pH on enzyme activity

2.7 重组木聚糖酶的最适反应温度

分别在 65 ~ 100 °C 区间,每隔 5 °C 测定重组木聚糖酶的酶活。从图 6 可以看出,重组木聚糖酶的最适反应温度大于等于 100 °C。

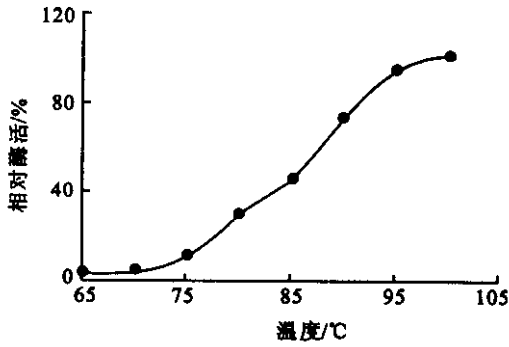


图6 温度对酶活的影响

Fig. 6 Effect of temperature on enzyme activity

2.8 重组木聚糖酶 pH 值的稳定性

酶在不同的 pH 值条件下 80 °C 保温 2 h ,再分别测定残留酶活性与 4 °C 保温的酶活相比 ,计算百分比。从图 7 可以看出 ,重组木聚糖酶在 pH 值 4.2 ~ 7.5 都比较稳定 ,相对酶活都在 80% 以上。

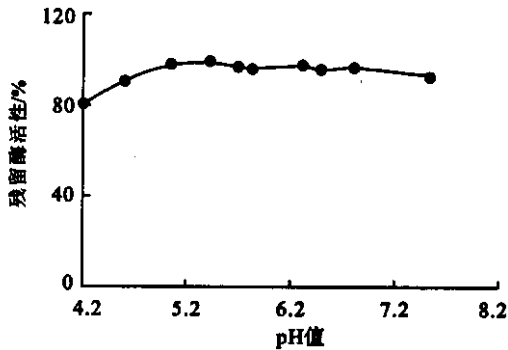


图7 pH 值对酶的稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH on enzyme stability

2.9 重组木聚糖酶温度的稳定性

酶在不同的温度下保温 2 h ,再分别测定残留酶活性 ,以未保温的酶所测酶活为 100% ,计算相对酶活。从图 8 可以看出 ,重组木聚糖酶的温度稳定性非常好 ,在 90 °C 下保温 2 h 后 ,残存酶活和没保

温酶的酶活相比还有 90% ,在 100 °C 下保温 2 h 后还有 60% 。

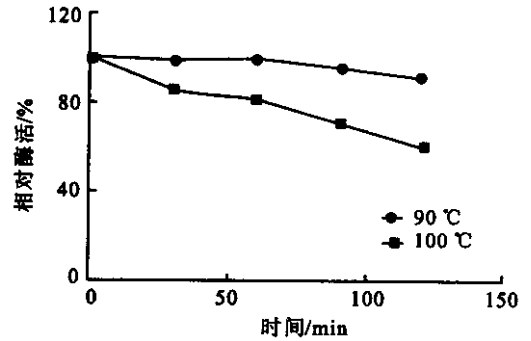


图8 温度对酶的稳定性的影响

Fig. 8 Effect of temperature on enzyme stability

3 结论

利用重组大肠杆菌生产基因工程产品具有极大的应用价值 ,然而进行大规模生产必须克服许多困难 ,其中主要包括有机酸类代谢副产物的积累抑制细菌自身生长和外源基因高表达引起宿主细胞生理负担过重等^[6,7]。这要求必须优化诱导时间、诱导时期和诱导剂的浓度等 ,使重组大肠杆菌既能高密度生长又能高效率表达外源目的蛋白 ,为以后工业生产摸索条件。

本实验选用 IPTG 作为诱导剂 ,因为 IPTG 在诱导强度、诱导时间、诱导持续性上具有优势 ,而且高密度培养过程中利用 IPTG 能有效地提高发酵罐的使用率和单位体积培养基的使用率。通过优化表达条件 ,得到 OD₆₀₀ 为 1.2 左右时加 IPTG 诱导最好 ,0.5 ~ 5.0 mmol/L 浓度的 IPTG 诱导重组菌表达极耐热木聚糖酶的效果基本相同 ,IPTG 诱导 8 h 后极耐热木聚糖酶的表达量基本维持不变 ,重组极耐热木聚糖酶的酶学性质与原始木聚糖酶基本相同 ,分别为最佳反应温度大于 100 °C ,在 100 °C 下保温 2 h ,酶活还有 60% ,pH 值稳定范围较广。

参考文献 :

- [1] 邵蔚蓝,薛业敏.以基因重组技术开发重大生物资源-半纤维素[J].无锡轻工大学学报,2001(3):12-15.
- [2] Christoph Winterhalter, Wolfgang Liebl. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61(5):1810-1815.
- [3] [美] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 黄培堂译. 北京:科学出版社, 2002.
- [4] [美] Robert F Weaver. 分子生物学(影印版)[M]. 北京:科学出版社, 2001.
- [5] Lever M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates[J]. *Anal Biochem*, 1972, 47:273.
- [6] van de Walle M, Shiloach J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *E. coli* strains during high density fermentation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 57(1):71-78.
- [7] Domingues J, Lima N, Teixeira JA, et al. Contamination of a high-cell-density continuous bioreactor[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 71:584-587.