研究论文

一种耐低温 α-乙酰乳酸脱羧酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达

李静静，徐美娟，张 显，饶志明*

（江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122）

摘要：从 *Bacillus subtilis* L5-20 染色体上克隆得到 ALDC 基因 *als*D，构建重组表达载体 pMA5-*als*D-His，将其转化到 *B. subtilis* WB600 中。SDS-PAGE 结果显示 ALDC 在重组 *B. subtilis* WB600 中成功表达，其相对分子质量(M_r)为 32×10^3。采用 Ni 柱亲和层析纯化重组 ALDC，所得纯酶的比酶活为 272.3 U/mg，总回收率为 89.8%。该重组 ALDC 最适反应温度仅为 25 ℃，在 20~35 ℃范围内均表现出较高的活性。Ni^{2+}对 ALDC 有一定的激活作用，Fe^{3+}使 ALDC 活性完全丧失。经摇瓶培养，重组菌的 ALDC 酶活为 27.0 U/mL，约为出发菌酶活的 70 倍。经 5 L 的发酵罐发酵放大试验，ALDC 酶活最高可达 75.9 U/mL。

关键词：枯草芽孢杆菌；α-乙酰乳酸脱羧酶；耐低温；双乙酰；Ni 柱亲和层析；酶学性质

中图分类号：Q 939.97　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)05—0516—08

High-Level Expression of Cold-Adapted α-acetolactate Decarboxylase in *Bacillus subtilis*

LI Jing-jing, *XU Mei-juan*, *ZHANG Xian*, *RAO Zhi-ming**

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: α-Acetolactate decarboxylase (ALDC) gene *als*D was cloned from *Bacillus subtilis* L5-20 and constructed into pMA5. The recombinant plasmid pMA5-*als*D-His was transformed into *B. subtilis* WB600. SDS-PAGE indicated that alsD gene was successfully expressed in recombinant *B. subtilis* and the molecular mass of ALDC was 32×10^3. Recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. The specific activity and total yield of the purified enzyme were 272.3 U/mg and 89.8%, respectively. The optimum temperature of purified ALDC was 25 ℃. And the enzyme showed high activity between 20 ℃ and 35 ℃. The enzyme activity was activated by Ni^{2+} and totally inhibited by Fe^{3+}. When cultured in shake-flask, the ALDC activity of the recombinant strain was approximately 70-fold higher than that of original strain. The result of scaled-up

收稿日期：2013-03-05

基金项目：国家 973 计划项目(2012CB725202)；国家 863 计划项目(2011AA02A211)；国家自然科学基金项目(21276110，30970056)；教育部新世纪优秀人才计划项目(NCET-10-0459)；高等学校博士学科点科研基金专项(20110093120001)；中央高校基本科研资金专项(JUSRP51306A)；江苏高校优势学科建设工程项目。

* 通信作者：饶志明(1975—)，男，江西临川人，农学博士，教授，博士研究生导师，主要从事工业微生物育种和发酵代谢方面的研究。E-mail：raozm@yahoo.com.cn

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

experiment showed that the enzyme activity was 75.9 U/mL in 5 L fermentor.

Keywords: *Bacillus subtilis*, α-acetolactate decarboxylase (ALDC), cold-adapted, diacetyl, Ni column affinity chromatography, characterization

双乙酰(Diacetyl，DA)是一种重要的风味物质，可以使黄油、奶油、脱脂乳和许多新鲜发酵的乳制品具有特殊风味和香气[1]。DA 含量也是判断啤酒成熟与否的重要指标，啤酒中 DA 的口味阈值较低，只有 0.02~0.10 mg/L，当其含量超过阈值时就会给啤酒带来不愉快的味道[2]。α-乙酰乳酸脱羧酶(α-acetolactate decarboxylase，α-ALDC，EC.4.1.1.5)能催化 DA 的前体物 α-乙酰乳酸快速脱羧形成乙偶姻，避免了 DA 的生成[3]，它可以缩短啤酒熟化周期，提高生产效率，具有极大的经济价值。

ALDC 于 1952 年首次从产气肠杆菌中分离得到，之后很多学者就该酶在生物界中的分布及基因克隆等展开了研究。Godtfredsen 等[4]的研究表明，很多细菌具有 ALDC 活性，但目前在真菌、海藻和原生动物等真核生物中还未发现该酶的存在。酿酒酵母不含有 ALDC 基因，而细菌中天然存在的 ALDC 产量也很低，因此，要想将该酶应用于啤酒工业，研究 ALDC 的分子结构以及 ALDC 基因，进行基因的克隆和表达，提高酶的产量，是必然的选择。随着对 ALDC 分子水平研究的深入，ALDC 基因已经从多种菌株中克隆得到[5-8]，并在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和酵母中获得了不同程度的表达。高健等[9]从枯草芽孢杆菌 BD-5 克隆得到了 ALDC 基因，并在大肠杆菌中获得了表达，但是酶活不高。李联政等[8]从枯草芽孢杆菌 168 中扩增到 ALDC 基因，在大肠杆菌中表达酶活为 0.11 U/mL。廖东庆等[10]将 ALDC 表达原件整合到枯草芽孢杆菌基因组中，得到的 ALDC 酶活为 15.6 U/mL。有关酵母中整合表达的研究显示，ALDC 表达的酶活较低。不同来源的 ALDC 的最适温度及稳定性等性质存在差异，已报道的 ALDC 最适作用温度集中在 30~40 ℃，丹麦诺维信公司开发的 ALDC 酶制剂 Maturex 的最适作用温度也达到了 35~40 ℃。而啤酒生产中正常的发酵温度只有 10 ℃左右，在该温度下，ALDC 酶活力只能达到其最高活力的 15%~20%，这大大削弱了酶的作用效率，造成极大的浪费，同时也提高了生产成本。因此获得一种耐低温 ALDC 就具有了十分重要的意义。

作者所在实验室前期通过低温筛选得到一株 ALDC 活性较高的菌株 *Bacillus subtilis* L5-20，获得的纯酶在啤酒发酵中进行了初步试验，能有效降低 DA 的含量，但原始菌 ALDC 的表达量偏低。本研究中以 *Bacillus subtilis* L5-20 为出发菌，克隆其 ALDC 基因，构建重组枯草芽孢杆菌。对重组 ALDC 进行 Ni-NTA 柱纯化，并进行了酶学性质分析，以及在 5 L 的发酵罐放大实验研究，以期获得高表达且更适用于啤酒发酵的 ALDC，为其工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

B. subtilis L5-20 由作者所在实验室前期筛选获得，大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 *B. subtilis* WB600 由作者所在实验室保藏，克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司，表达载体 pMA5 由作者所在实验室保藏。

1.2 主要试剂与培养基

工具酶、IPTG，购自 TaKaRa 公司；质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、咪唑、抗生素、α-萘酚、肌酸、2-(N-马啉代)乙磺酸和 Brij35，购自上海 Sangon 公司；丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(American Promega Corporation)、广范围蛋白质分子量标准，购自 Fermentas 公司；2-乙酰基-2-甲基乙酰乙酸乙酯(ethyl-2-acetoxy-2- methylacetocetate)，购自 Sigma Aldrich 公司；PCR 引物，由上海赛百盛基因技术有限公司合成；其他试剂均为国产试剂纯。

LB 培养基：酵母粉 0.5 g/dL，蛋白胨 1 g/dL，NaCl 1 g/dL，pH 7.0。

发酵产酶培养基：大豆蛋白胨 1 g/dL，葡萄糖 4 g/dL，玉米浆 1.5 g/dL，尿素 0.3 g/dL，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.17 g/dL，KH_2PO_4 0.23 g/dL，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075 g/dL，NaCl 5 g/dL，pH 6.8~7.0。

1.3 主要试剂配制

酶活测定缓冲液 MES I(pH 6.0)：0.05 mol/L 2-

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(N-马啉代) 乙磺酸、0.05 g/dL Brij35、0.6 mol/L NaCl,用 1 mol/L NaOH 调 pH。

底物缓冲液 MES Ⅱ (pH 6.0):0.05 mol/L 2-(N-马啉代)乙磺酸,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 6.0。

显色剂:将质量分数 5% α-萘酚(用正丙醇溶解)、质量分数 10% NaOH、质量分数 0.5%肌酸、蒸馏水按比例(1:1:1:6.8)混合。注意,显色剂要在用前配置,另外 α-萘酚要避光保存。

底物:取 100 μL 2-乙酰基-2-甲基乙酰乙酸乙酯,加入 6 mL 0.5 mol/L NaOH,不停晃动 20 min 后,用 0.5 mol/L HCl 调 pH 6.0,用 MES Ⅱ缓冲液定容至 50 mL。注意,该底物溶液需在使用前配制。

1.4 ALDC 基因 *als*D 的克隆及表达载体的构建

根据 NCBI 枯草芽孢杆菌的全基因组核酸序列中 ALDC 的基因序列,设计一对引物 Forward/Reverse(见表 1),在下游序列插入 6 个 His 编码基因(斜体部分),并在引物的 5'端分别加上相应的酶切位点(下划线部分)。

提取 *B. subtilis* L5-20 染色体 DNA 为模板,以 Forward/Reverse 引物进行 PCR 扩增获得目的基因片段 *als*D-His,PCR 扩增条件为:94 ℃预变性 1 min,然后 94 ℃变性 1 min;56 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min 30 s,30 个循环;72 ℃延伸 10 min。所得基因片段经胶回收后与克隆载体 pMD18-T 连接,转化 *E. coli* JM109,经过氨苄青霉素抗性平板筛选,挑取阳性转化子。提取质粒酶切鉴定,将重组质粒命名为 T-*als*D-His,DNA 测序由上海 Sangon 公司完成。经测序验证正确的重组质粒 T-*als*D-His,用 *Bam*H Ⅰ和 *Mlu* Ⅰ双酶切后连接到经相同酶切的 pMA5 上,构建表达载体 pMA5-*als*D-His。

表 1 文中所涉及的引物

Table 1 Primers used in this study

名称	引物序列	酶切位点
Forward	5'-ACCG GGATCC ATGAAACGAG AAAGCAAC-3'	*Bam*H Ⅰ
Reverse	5'- ACCG ACGCGT TTA *GTGGTGGTGGTGGTGGTG* TTCAGGG CTTCCTTC -3'	*Mlu* Ⅰ

1.5 ALDC 在枯草芽孢杆菌中的表达

将构建好的表达载体 pMA5-*als*D-His 转化至 *B. subtilis* WB600 中,转化过程参照 Spizizen 所述的方法进行。在卡那霉素抗性平板上筛选阳性重组子,并经酶切验证。将经验证正确的重组菌 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 接种至含有 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 ℃过夜培养,次日以 1%的接种量转接至 50 mL LB 液体培养基中 37 ℃培养 16 h。将发酵液于 10 000 r/min 4 ℃离心 15 min,发酵液上清液用于重组菌胞外 ALDC 酶活的测定,收集菌体,用 0 质量分数.85% NaCl 洗涤 2 次,然后悬浮于 MES Ⅰ(pH 6.0)缓冲液中。采用超声波细胞破碎法破碎细胞(300 W,工作 2 s 停 5 s,工作时间 10 min),15 000 r/min 4 ℃离心 30 min,所得上清液用于重组菌胞内 ALDC 酶活的测定。

1.6 酶的 Ni-NTA 纯化

发酵后离心收集菌体,用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次,重悬于 McAc-0 溶液 (20 mM Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,质量分数 10% 甘油),采用超声破碎制得粗酶液,经 0.45 μm 滤膜过滤后,采用 Ni-NTA 蛋白纯化柱纯化目的蛋白质,经过两次上样,依靠蛋白末端 6 个 His 与 Ni-NTA 的金属离子进行螯合。洗脱过程首先用不含有咪唑的缓冲液洗柱,目的是洗脱未与 Ni-NTA 结合的细胞体杂蛋白,然后用不同浓度的咪唑(20~300 mmol/L)缓冲液进行梯度洗脱,根据蛋白质的大小与金属离子的结合牢固程度,在一定的咪唑浓度条件下,可以得到较纯的酶液。蛋白质含量采用 Bradford 法测定,以 BSA 为标准蛋白。

1.7 ALDC 酶活力的测定

参照 Garmyn[7],陈卿[11]等所述的方法并加以调整。

ALDC 催化 α-乙酰乳酸脱羧生成乙偶姻,乙偶姻在碱性条件下可以与肌酸和 α-萘酚的混合物反应生成红色的物质,在一定的范围内生成的红色物质的吸光值与乙偶姻的含量成正比,根据这一原理,来测定 ALDC 的活性。一个单位酶活(U)定义为:在 30 ℃,pH 6.0 的反应条件下,1 min 使 a-乙酰乳酸脱羧形成 1 μmol 乙偶姻所需的酶量。

标准曲线的测定:取溶于 MES Ⅰ的乙偶姻各 400 μL(乙偶姻的含量分别为 5、10、15、20、25 μg),加入显色剂 4.6 mL,30 ℃水浴 30 min 显色后于 520 nm 处测吸光值,以 400 μL MES Ⅰ加 4.6 mL 显色剂作为空白对照。绘制得到的标准曲线用于下一步酶活的计算。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

酶活的测定：200 μL 酶液与 200 μL 底物混合，在 30 ℃水浴反应 10 min 加入 4.6 mL 显色剂 30 ℃水浴 30 min 显色，520 nm 处测定吸光值。

1.8 酶学性质的研究方法

1.8.1 最适 pH 及 pH 稳定性 用底物缓冲液 MES II 配制不同 pH(3.0~11.0)的底物溶液，将酶液用 MES I 稀释一定倍数，然后将不同 pH 的底物 380 μL 与稀释好的酶液 20 μL 反应，测定不同 pH 条件下 ALDC 的活性，考察 pH 值对其酶促反应的影响。配制不同 pH(5.0~10.0)的酶活测定缓冲液 MES I，用它们来稀释酶液得到不同 pH 的酶液。让酶处于不同 pH 环境中，每隔一定时间取样，测定酶的剩余活性；反应体系为：20 μL 酶液，180 μL MES I，200 μL 底物。以蒸馏水代替酶液作为空白对照，考察该酶在不同 pH 条件下的稳定性。

1.8.2 最适温度及温度稳定性 在 10~45 ℃设置 8 个反应温度 10、15、20、25、30、35、40、45 ℃，测定不同温度条件下 ALDC 的酶活力，确定其最适反应温度。将适当稀释的酶液分别在 -20、0、25、35、45、55、65、75 ℃保温，每隔 2 h 取样，测定不同温度下酶的剩余活力，从而研究该酶在不同温度下的稳定性。

1.8.3 不同金属离子以及 EDTA 对酶活的影响 分别在反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的 Ca^{2+}、Sn^{2+}、Ni^{2+}、Zn^{2+}、Li^{+}、Mn^{2+}、K^{+}、Na^{+}、Mg^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}离子以及 EDTA，以不加金属离子的反应体系为对照，研究各金属离子对 ALDC 酶活的影响。

1.8.4 K_m 值及 V_{max} 的测定 配置不同浓度的 α-乙酰乳酸底物溶液，分别进行酶促反应，反应时间控制在 2 min。采用 Lineweaver-Burk 作图法确定 ALDC 的 K_m 及 V_{max} 值。

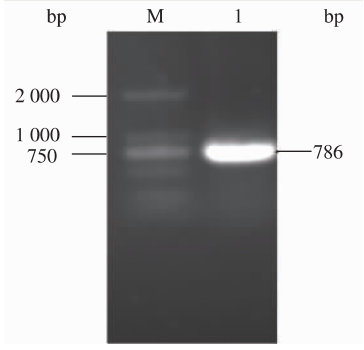
1.9 重组枯草芽孢杆菌的产酶发酵培养 重组枯草芽孢杆菌 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 经 LB 液体培养基活化后，按 1%的接种量转接至 50 mL 发酵产酶培养基中，于 37 ℃培养 36 h，进行 ALDC 酶活测定。并在 5 L 的发酵罐上进行放大试验，装液量为 2.5 L，接种量 4%，转速 350 r/min，通气量 1 L/(L·min)，37 ℃培养 48 h，发酵过程中跟踪检测菌体浓度、残糖含量及 ALDC 酶活力。

2 结果与分析

2.1 ALDC 基因的克隆及表达载体的构建

提取 *B. subtilis* L5-20 全基因组 DNA，用所设计的引物进行 PCR 扩增，得到长度为 786 bp（其中包含 18 bp 的 His 编码序列）的基因片段(图 1)。

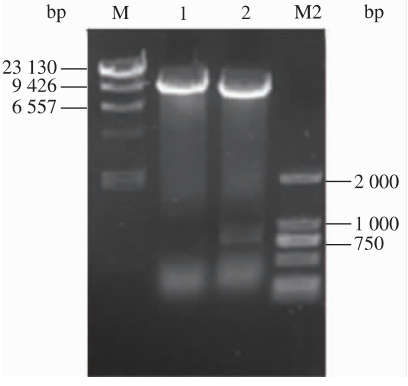
将 T-*als*D-His 用 *Bam*H I 和 *Mlu* I 进行双酶切，将其与经相同酶切线性化的表达载体 pMA5 连接，转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞中。获得的重组表达载体 pMA5-*als*D-His 经 *Bam*H I 和 *Mlu* I 双酶切验证(图 2)，得到约 7 000 bp 和 780 bp 大小的片段，分别对应线性 pMA5 和 *als*D-His 的大小，表明外源基因 *als*D-His 已经正确连接到表达载体 pMA5 上。



M:DL2000 marker;1-2:PCR products

图 1 *als*D 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *als*D gene



M1: λ-Hind Ⅲ marker;
1: pMA5-alsD-His/BamH I;
2: pMA5-alsD-His/BamH I+Mlu I;
M2: DL2000 marker.

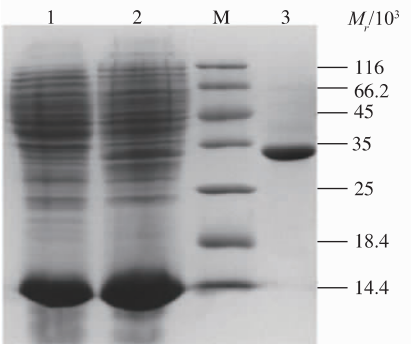
图 2 重组质粒 pMA5-*als*D-His 的酶切验证

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pMA5-*als*D-His by enzyme digestion

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 *als*D 基因在 *B. subtilis* WB600 中的表达及重组蛋白 ALDC 的纯化

将重组载体 pMA5-*als*D-His 转化至 *B. subtilis* WB600 中，在卡那霉素抗性平板上筛选阳性重组子，即得重组菌株 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600，将其接种于 LB 液体培养基培养 16 h，收集菌体并洗涤，菌体用 MES I 缓冲液悬浮，采用超声波破碎细胞，破碎上清液 SDS-PAGE 分析结果显示，重组蛋白相对分子质量(M_r)约为 32×10^3，与预期分子量大小相符，表明 ALDC 在 *B. subtilis* WB600 成功获得了表达。同时测定粗酶液中的蛋白含量以及酶活力，得知其中蛋白含量为 91.0 mg，总酶活为 3 395.0 U，比酶活为 37.3 U/mg。经 Ni-NTA 纯化后得到较纯的酶液，测得其中蛋白含量为 11.2 mg，总酶活为 3 050.0 U，比酶活为 272.3 U/mg，纯化后的比酶活是纯化前的 7.3 倍，酶活回收率为 89.8%。SDS-PAGE 结果(图 3)看出经过纯化得到较纯的重组 ALDC 蛋白，纯化效果见表 2。



1: pMA5 /*B. subtilis* WB600;
2: pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600;
M: standard protein molecular weight marker;
3: purified ALDC from pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600.

图 3　重组枯草芽孢杆菌 ALDC 表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of expressed and purified recombinant ALDC

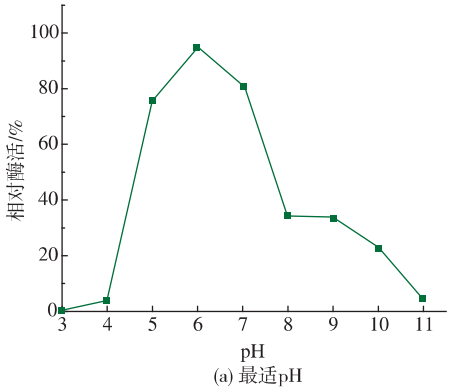
表 2　重组蛋白 ALDC 纯化情况

Table 2　Purification of recombinant ALDC

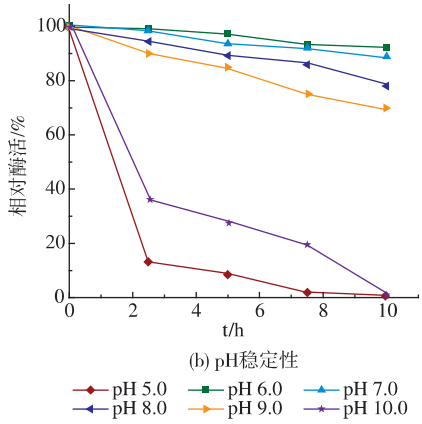
纯化步骤	蛋白质量/mg	总酶活/U	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
Crude enzyme	91.0±2.5	3395.0±5	37.3	1.0	100
By Ni-NAT	11.2±0.3	3050.0±3.8	272.3	7.3	89.8

2.3 重组 ALDC 的酶学性质

2.3.1 最适 pH 值及 pH 稳定性　配置 pH 3.0~11.0 的反应缓冲液，分别测定不同 pH 下 ALDC 的酶活力，结果见图 4。由图 4(a)可知，ALDC 在 pH 5.0~7.0 范围内均具有较高的活力，最适 pH 为 6.0。当 pH 大于 7.0 时酶活力迅速下降，pH 8.0 和 pH 9.0 条件下的酶活力约为最大酶活的 34%，在 pH 3.0~4.0 及 pH 11.0 条件下酶活几乎为零。



(a) 最适pH



(b) pH稳定性

图 4　α-乙酰乳酸脱羧酶的最适 pH 及其 pH 稳定性

Fig. 4　Optimal pH and pH stability of ALDC

将 ALDC 分别在 pH 5.0~10.0 条件下处理，测定酶活性。从图 4(b)中可以看出，ALDC 在 pH 6.0~9.0 环境中较稳定，在 pH 6.0 和 pH 7.0 条件下处理 10 h 后，剩余酶活仍在 90%以上；在 pH 8.0 和 pH 9.0 条件下处理 10 h 后，剩余酶活也在 70%以上。在

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

pH 5.0 与 pH 10.0 环境下，该酶的活性在 2.5 h 内迅速下降，并且在 10 h 后活性完全消失。表明该重组 ALDC 较适应中性范围的环境，对酸性及强碱性环境敏感。

2.3.2 最适温度及热稳定性　在 10~45 ℃范围内，进行 ALDC 的酶促反应，结果如图 5(a)所示，随着温度的升高，ALDC 酶活呈上升的趋势，在 25 ℃时达到最大值，此后开始呈下降趋势，在 20~35 ℃范围内，ALDC 显示较高的活力，最适反应温度为 25 ℃。

将重组 ALDC 分别在-20、0、25、35、45、55、65、75 ℃条件下保存一定的时间后，测定酶活力大小。结果如图 5(b)显示，在 25 ℃以下，该酶非常稳定，保温 10 h 后剩余酶活仍有 95%左右。在 35 ℃和 45 ℃环境下保存 10 h 后剩余酶活分别在 60%和 70%以上。55 ℃时保温 10 h 后剩余酶活力不足 20%。而当温度升高到 65 ℃时，保存 4 h 即接近完全失活。

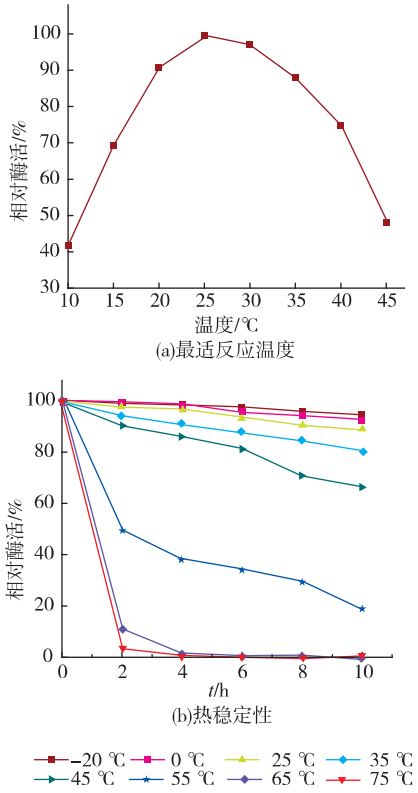


图 5　α-乙酰乳酸脱羧酶的最适反应温度及其热稳定性

Fig. 5　Optimal temperature and thermal stability of ALDC

2.3.3 金属离子以及 EDTA 对酶的影响　通过单独添加相同终浓度(1 mmol/L)的不同金属离子以及 EDTA，研究它们对 ALDC 酶活力的影响，结果如表 3 所示。Ni^{2+}对 ALDC 有一定的激活作用，Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mn^{2+}、Sn^{2+}、Zn^{2+}、Na^{+}、K^{+}、Li^{+}、EDTA 对其活性有不同程度的抑制作用，其中 Ca^{2+}的抑制作用最小，Cu^{2+}、Mn^{2+}、Sn^{2+}、Zn^{2+}次之，Na^{+}、K^{+}、Li^{+}、EDTA 的抑制作用较为强烈，而 Fe^{3+}使 ALDC 活性完全丧失，Mg^{2+}对 ALDC 既没有激活也没有抑制作用。

表 3　金属离子及 EDTA 对 ALDC 的影响

Table 3　Effect of ions and EDTA on ALDC

金属离子与 EDTA 浓度/(1 mmol/L)	相对酶活/%
None	100
Ca^{2+}	90.6±2.9
Sn^{2+}	71.9±1.2
Ni^{2+}	114.0±2.7
Zn^{2+}	65.6±0.2
Li^{+}	59.4±1.5
Mn^{2+}	82.8±2.4
K^{+}	41.0±3.5
Na^{+}	68.9±2.1
Mg^{2+}	100±2.3
Cu^{2+}	83.6±1.6
Fe^{3+}	0
EDTA	57.4±3.0

2.3.4 K_m 值及 V_{max} 的测定　根据不同底物浓度与酶促反应的关系，按照米氏方程，采用 Lineweaver-Burk 作图法，计算得出重组 ALDC 的 K_m 及 V_{max} 值。如图 6 所示，ALDC 的 K_m 值为 29.04 μmol/L，V_{max} 为 2.82 mmol/(L·min)。

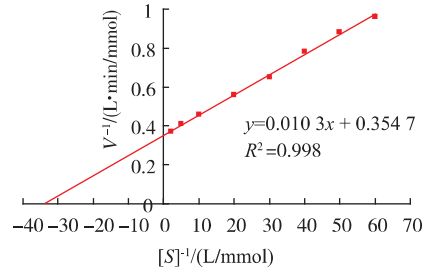


图 6　ALDC 的 Lineweaver-Burk 作图

Fig. 6　Lineweaver-Burk plot of recombinant ALDC

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 重组枯草芽孢杆菌 ALDC 的表达

将 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 接种至 LB 液体培养基中 37 ℃培养 16 h。经测定，胞外 ALDC 酶活为 4.9 U/mL，胞内 ALDC 酶活为 22.1 U/mL，总酶活为 27.0 U/mL，约为出发菌 *B. subtilis* L5-20 ALDC 总酶活的 70 倍。

2.5 重组枯草芽孢杆菌 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 的发酵产酶研究

重组枯草芽孢杆菌经 LB 液体培养基活化后，按 1%的接种量转接至 50 mL 发酵产酶培养基，于 37 ℃培养 36 h，ALDC 酶活测定结果显示，胞外 ALDC 酶活为 22.6 U/mL，胞内酶活为 43.2 U/mL，总酶活为 65.8 U/mL。

将重组菌在 5 L 的发酵罐中进行放大试验，结果见图 7。随着发酵的进行，菌体量在前期呈现不断上升的趋势，36 h 时达到最大值，此后进入平衡期并开始缓慢下降；ALDC 酶活的变化与菌体量呈现相似的趋势，在 36 h 达到最大，约 75.9 U/mL，其中胞内、胞外 ALDC 酶活分别为 46.6 U/mL 和 29.3 U/mL。

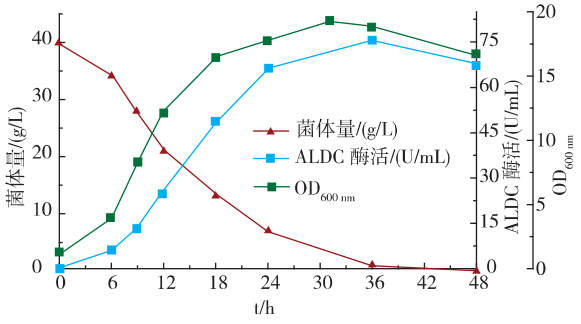


图 7 重组枯草芽孢杆菌 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 5 L 罐发酵结果

Fig. 7 Fermentation results of pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600 in 5 L bioreactor

3 结 语

从一株耐低温 *B. subtilis* L5-20 中克隆得到 alsD 基因，将其连接到表达载体 pMA5 上，并转化 *B. subtilis* WB600，构建重组菌 pMA5-*als*D-His/*B. subtilis* WB600。选用 Ni 柱亲和层析纯化重组 ALDC，纯化后比酶活达 272.3 U/mg，回收率为 89.8%，纯化倍数为 7.3，并用所得的纯酶进行了酶学性质的研究。这是 *B. subtilis* ALDC 首次在枯草芽孢杆菌中的游离表达和纯化。

已报道的 ALDC 最适作用温度都在 40 ℃左右。Rasmussen 等[12]从干酪乳杆菌中纯化出的 ALDC 的最适温度为 40 ℃。Ohshiro 等[13]研究了乙酰短杆菌的 ALDC，最适反应温度也为 40 ℃，60 ℃以上迅速失活。尹东等[14]的研究显示，产气肠杆菌 ALDC 的适合温度为 35~45 ℃。郑华军等[15]研究的地衣芽孢杆菌 ALDC 最适温度为 40 ℃，且对热(40 ℃以上)敏感。作者研究获得的重组 ALDC 最适温度为 25 ℃，在 20~35 ℃范围内均表现出较高的活性，该酶显示出一定的耐低温特性，在 15 ℃酶活力还保留在最高活力的 70%左右，10 ℃时酶活力仍保留在最高活力 40%以上，这一优异的特性使它更加适合啤酒生产的条件，极大地提高了酶的催化效率，降低了生产成本。

本研究小组前期将 *B. subtilis* L5-20 的 *als*D 基因在大肠杆菌中表达，ALDC 酶活为 10.3 U/mL，虽然酶活比之前的报道有较大提高，但利用大肠杆菌表达系统表达来源于枯草芽孢杆菌的 ALDC 效果并不理想。且考虑到大肠杆菌属于潜在致病菌，不适用于食品添加剂用酶的工业化应用；并且目前利用大肠杆菌表达系统表达的蛋白质多为胞内表达，后期提取工艺较复杂，因此从安全性和操作成本上分析，选择一种高效胞外表达枯草芽孢杆菌基因的宿主是非常必要的。ALDC 作为食品工业酶制剂，对其安全无毒害的要求较为严格，而枯草芽孢杆菌有长期制备发酵食品的历史，不产内毒素和致热敏蛋白质，是一种公认安全的微生物，无论是作为出发菌还是宿主菌都具有很强的可行性。虽然原始菌 *B. subtilis* L5-20 具有 ALDC 活性，但是其表达量对于工业酶制剂生产来说还远远不够。鉴于以上因素，作者采用基因工程手段，选择枯草芽孢杆菌作为表达的宿主菌，将 *als*D 基因在 *B. subtilis* WB600 中获得高效表达，重组菌经 LB 培养后 ALDC 酶活达 27.0 U/mL，约为出发菌酶活的 70 倍。而经发酵培养基培养，ALDC 酶活高达 65.8 U/mL，再经 5 L 的发酵罐放大试验，ALDC 酶活达 75.9 U/mL(其中胞内胞外 ALDC 酶活分别为 46.6 U/mL 和 29.3 U/mL)，较出发菌得到了极大地提升，较先前在大肠杆菌中表达的酶活也提高了很多，与已报道的重组菌酶活相比有很大的优势，该重组菌具有很好的开发潜力。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Curic M，Stuer-Lauridsen B，Renault P，et al. A general method for selection of α-acetolactate decarboxylase-deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve diacetyl formation[J]. **Appl Environ Microbiol**，1999，65：1202-1206.

[2] **韦函忠，马少敏，韦朝英. 啤酒发酵中双乙酰的产生和 α-乙酰乳酸脱羧酶的应用**[J]. **广西轻工业**，2011(8)：17-19.
WEI Han-zhong，MA Shao-min，WEI Chao-ying. Diacetyl generation and the application of α-acetolactate decarboxylase in beer fermentation[J]. **Guangxi Journal of Light Industry**，2011(8)：17-19.（in Chinese）

[3] Suihko M L，Blomqvist K，Penttila M，et al. Recombinant brewer's yeast strains suitable for accelerated brewing[J]. **J Biotechnol**，1990，14：85-300.

[4] Godtfredsen S E，Lorck H，Sigsgaard P. On the occurrence of α-acetolactate decarboxylases among microorganisms[J]. **Carlsberg Res Commun**，1983，48：239-247.

[5] Repizo G D，Mortera P，Magni C. Disruption of the *als*SD operon of *Enterococcus faecalis* impairs growth on pyruvate at low pH [J]. **Microbiology-Sgm**，2011，157：2708-2719.

[6] **张燎原，孙建安，魏东芝，等. 粘质沙雷氏菌中乙偶姻合成途径基因克隆、序列分析及表达**[J]. **江西农业大学学报**，2011，33(5)：0987-0992.
ZHANG Liao-yuan，SUN Jian-an，WEI Dong-zhi，et al. Cloning，sequence analysis and heterogenous expression of the genes involved in acetoin pathway from *Serratia marcescens* H_{30}[J]. **Acta Agricultural Universitatis Jiangxiensis**，2011，33(5)：0987-0992.（in Chinese）

[7] Garmyn D，Monnet C，Martineau B，et al. Cloning and sequencing of the gene encoding α-acetolactate decarboxylase from *Leuconostoc oenos*[J]. **FEMS Microbiol Lett**，1996，145：445-450.

[8] **李联政，张惟材，汪建华，等.** α-**乙酰乳酸脱羧酶在大肠杆菌中的克隆表达**[J]. **生物技术通讯**，2005，16(6)：618-620.
LI Lian-zheng，ZHANG Wei-cai，WANG Jian-hua，et al. Cloning and expression of α-acetolactate decarboxylase gene in *E. coli* [J]. **Lett Biotechnol**，2005，16(6)：618-620.（in Chinese）

[9] **高健，铁翠娟，王忠彦，等. 枯草芽孢杆菌** α-**乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆及表达**[J]. **微生物学通报**，1998，25(6)：336-339.
GAO Jian，TIE Cui-juan，WANG Zhong-yan，et al. Cloning and expression of α-acetolactate decaroboxylase gene of *Bacillus subtilis*[J]. **Microbiology**，1998，25(6)：336-339.（in Chinese）

[10] **廖东庆，陈发忠，岳田芳，等.** α-**乙酰乳酸脱羧酶基因在枯草芽孢杆菌中的整合型表达**[J]. **基因组学与应用生物学**，2010，29(5)：843-848.
LIAO Dong-qing，CHEN Fa-zhong，YUE Tian-fang，et al. Integrative expression of α-acetolactate decaroboxylase gene in *Bacillus subtilis*[J]. **Geno Appl Biol**，2010，29(5)：843-848.（in Chinese）

[11] **陈卿，蔡国林，陆健. 树脂固定化** α-**乙酰乳酸脱羧酶的初步研究**[J]. **食品工业科技**，2011，32(2)：154-158.
CHEN Qing，CAI Guo-lin，LU Jian. Preliminary study on immobilization of α-acetolactate decaroboxylase by resin[J]. **Science and Technology of Food Industry**，2011，32(2)：154-158.（in Chinese）

[12] Rasmussen A M，Gibson R M，Godtfredsen S E，et al. Purification of α-acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547[J]. **Carlsberg Res Commun**，1985，50：73-82.

[13] Ohshiro J，Aisaka K，Uwajima T. Purification and chareterization of α-acetolactate decarboxylase from *Brevibacterium acetylicum* [J]. **Agric Biol Chem**，1989，53(7)：1913-1918.

[14] **尹东，曾庆华，卢大宁，等. 产产气肠杆菌** α-**乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆和表达及影响重组酶活性的因素**[J]. **生物工程学报**，1999，15(4)：44-49.
YIN Dong，ZENG Qing-hua，LU Da-ning，et al. Cloning and expression of α-acetolactate decarboxylase gene for *Enterobacter aerogenes* and factors influencing the activity of the recombinant enzyme[J]. **Chin J Biotech**，1999，15(4)：44-49.（in Chinese）

[15] **郑华军，鲍晓明，侯爱华，等. 地衣芽孢杆菌** α-**乙酰乳酸脱羧酶的纯化及酶学性质**[J]. **山东大学学报**，2002，37(2)：180-183.
ZHENG Hua-jun，BAO Xiao-ming，HOU Ai-hua，et al. Purification and properties of α-acetolactate decarboxulase from *Bacillus licheniformis*[J]. **Journal of Shandong University**，2002，37(2)：180-183.（in Chinese）

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net