基于角质酶共表达策略的大肠杆菌胞外生产耐高温 α-淀粉酶及其发酵条件优化

李 祝[1]，段绪果[1,2]，宿玲恰[1,2]，吴 敬[*1,2]

（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122）

摘要：在前期工作中通过分子改造提高了来源于地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）α-淀粉酶在高温酸性条件下的稳定性，同时改良了催化效率。为了实现 α-淀粉酶在大肠杆菌 BL21（DE3）中的胞外高效表达，作者尝试采用共表达嗜热放线菌（*Thermobifida fusca*）角质酶来增强大肠杆菌膜透性，同时优化诱导策略以提高重组 α-淀粉酶的胞外表达。首先构建了能同时表达角质酶和 α-淀粉酶的工程菌 BL21（DE3）/pETDuet-*amy*-*cutinase*，并将此菌株与能单独表达 α-淀粉酶的工程菌 BL21（DE3）/pET-20b-*amy* 进行摇瓶和 3 L 发酵罐的产酶发酵对比。结果显示，共表达菌株在胞外产酶方面具有明显的优势。进一步对共表达菌株的诱导条件进行优化，在 32 ℃、诱导剂为 0.15 μmol/L IPTG 与 0.5 g/（L·h）乳糖条件下，发酵 32 h 后胞外 α-淀粉酶最高酶活力可达 6.05×10^4 U/mL，是单表达菌株摇瓶发酵水平的 28.3 倍。此时胞外重组 α-淀粉酶质量浓度为 8.92 g/L，重组蛋白质的分泌效率为 93.2%。

关键词：α-淀粉酶；角质酶；共表达；诱导策略

中图分类号：Q 815　**文章编号：**1673-1689（2019）11-0009-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.002

Enhancing Extracellular Production of Recombinant α-Amylase in *Escherichia coli* through Co-Expression with Cutinase and Optimizing Fermentation Conditions

LI Zhu[1]，*DUAN Xuguo*[1,2]，*SU Lingqia*[1,2]，*WU Jing*[*1,2]

（1. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：The thermostability and catalytic efficiency of *Bacillus licheniformis* α-amylase have been improved at high temperature and acidic conditions using site-directed mutations in our previous study. To achieve highly efficient extracellular production of this mutant α-amylase，the *Bacillus licheniformis* α-amylase was co-expressed with *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia*

收稿日期：2017-05-04

基金项目：国家自然科学基金杰出青年基金项目（31425020）；江苏省自然科学基金项目（BK20140132）；江苏省产学研前瞻性联合研究项目（BY2015019-32）。

* **通信作者：**吴 敬（1969—），女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品与发酵方面的研究。E-mail：jingwu@jiangnan.edu.cn

引用本文：李祝，段绪果，宿玲恰，等. 基于角质酶共表达策略的大肠杆菌胞外生产耐高温 α-淀粉酶及其发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（11）：9-17.

coli and the induction strategy was also optimized. First,the co-expression system was compared with individual expression system,which expressed α-amylase individually,in shake flask and fermenter. The results showed that co-expression system has advantages over individual expression system in extracellular production of α-amylase. Then,the extracellular production of recombinant α-amylase in co-expression system was optimized using different induction strategies. Using the optimal induction strategy of 32 ℃ and combined use of 0.15 μmol/L IPTG and 0.5 g/(L·h) lactose, the co-expression system achieved a maximum extracellular α-amylase activity of 6.05×10^4 U/mL (8.92 g/L) at 32 h,which was 28.3 fold to that of achieved by individual expression system in shake flask. In addition,the extracellular α-amylase activity occupied 93.2% of total α-amylase activity.

Keywords: α-amylase,cutinase,co-expression,induction strategy

耐高温 α-淀粉酶由于其优良的热稳定性而被广泛的应用于啤酒、酒精、氨基酸及淀粉等工业领域[1]。地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)α-淀粉酶(BLA) 在 pH 6~7 之间具有较好的热稳定性，而当 pH 在 6 以下时,BLA 的热稳定性将明显降低,并且催化效率也将受到抑制,不能满足酸性条件下淀粉原料深加工工艺的要求。在前期工作中,我们通过分子改造的手段提高了 BLA 在 95 ℃、pH 5.5 条件下的热稳定性，同时突变体的催化效率也得到提升,该突变体具有潜在的应用价值[2]。

大肠杆菌由于遗传背景清晰、培养成本低廉、能进行高密度发酵等优势,已被广泛应用于重组蛋白质的表达及生产[3]。相较于胞内表达,胞外表达重组蛋白质具有很多优势,例如:胞外表达可以提高重组蛋白质的稳定性和生物活性,并且胞外表达更加适合工业生产[4-5]。作者所在实验室的前期工作中发现,来源于嗜热放线菌(*Thermobifida fusca*)角质酶具有一定的磷脂酶水解活力,可以适量水解大肠杆菌细胞膜上的磷脂成分,从而增强大肠杆菌细胞膜透性,进而提高重组蛋白质的胞外表达效率[5]。在前期工作中,重组大肠杆菌表达 BLA 的 3 L 罐发酵研究表明,发酵上清液中重组 BLA 的分泌比例仅为 53%,大量的重组蛋白质仍然残留在细胞内。为了实现 BLA 的胞外高效表达,作者尝试采用在大肠杆菌中同时表达角质酶与 BLA 的方式来提高大肠杆菌细胞膜透性,从而提高 BLA 胞外分泌效率。随后对影响大肠杆菌产酶的诱导条件进行优化，以提高 BLA 的产量。

pETDuet-1 载体被设计用来在大肠杆菌中同时表达两个外源基因，该载体含有两个多克隆位点，并且每个多克隆位点是通过 T7 启动子、Lac 操纵子和一个核糖体结合位点组成。因此本研究将采用该载体在大肠杆菌中同时表达 BLA 和角质酶基因。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

含有突变后 *Bacillus licheniformis* α-淀粉酶基因的 *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET20b-*amy* 菌株：由作者所在实验室构建并保藏;*E. coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3)菌株及含有角质酶基因的共表达载体 pETDuet-cutinase:均由作者所在实验室保藏。

1.2 试剂与培养基

限制性内切酶 NcoI 和 HindIII、碱性磷酸酶(CIAP)、琼脂糖和标准核酸相对分子质量:均购自大连宝生物工程有限公司;质粒小提试剂盒和 DNA 回收试剂盒:购自田根生化科技有限公司;蛋白质标准相对分子质量和蛋白质电泳试剂盒:购自上海碧云天生物科技有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl β-D-1-Thiogalactopyranoside, IPTG)、氨苄青霉素 (Ampicillin,Amp)、卡那霉素(Kanamycin,Kan): 购自上海生物工程股份有限公司;酵母粉和蛋白胨:均购自英国 Oxiod 公司;其他试剂:均为国产分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司。

LB 种子培养基 (g/L): 蛋白胨 10，酵母粉 5，NaCl 10;摇瓶 TB 发酵培养基(g/L):蛋白胨 12,酵母粉 24，甘油 5，磷酸氢二钾 2.34，磷酸二氢钾 16.43;3 L 罐发酵培养基 (g/L): $(NH_4)_2HPO_4$ 4，

KH_2PO_4 13.5,$MgSO_4·7H_2O$ 1.38,一水合柠檬酸 1.7,蛋白胨 1,酵母粉 2,甘油 8,微量元素液 10 mL/L;3 L 罐补料培养基(g/L):甘油 600,$MgSO_4·7H_2O$ 15,蛋白胨 2,酵母粉 4;3 L 罐诱导培养基(g/L):乳糖 60;微量元素液 (g/L):$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 0.1,$CaCl_2$ 2.0,$MnSO_4·4H_2O$ 0.5,$FeSO_4·7H_2O$ 10.0,$CuSO_4·5H_2O$ 3.0,$ZnSO_4·7H_2O$ 5.3,$Na_2B_4O_7·10H_2O$ 0.2。

1.3 培养条件

1.3.1 摇瓶培养 将重组菌接种至含有相应抗性的种子培养基中,在 37 ℃、200 r/min 条件下培养 8 h,以 5%的接种体积分数接种至含有相应抗性的摇瓶发酵培养基中,37 ℃、200 r/min 下培养至菌体浓度 OD_{600} 达 1.0 时,加入终浓度为 0.02 mmol/L IPTG,随后将摇瓶至于 25 ℃、200 r/min 条件下继续培养 40 h 至发酵结束。

1.3.2 3 L 罐培养 将培养好的种子培养基以 10%的接种体积分数接种至 3 L 发酵罐中 (Labfors 5, Infors-HT Co.,Ltd)。在 3 L 罐上的发酵周期可分为 3 个阶段。在第一阶段中,控制发酵温度为 37 ℃,随着发酵时间的进行,发酵液中的甘油质量浓度和 pH 会逐步降低,当发酵液中的 pH 和溶解氧(DO)突然升高时,此时培养基中的甘油耗尽,发酵进入第二阶段。在此阶段中,需将补料培养基逐步加入至 3 L 罐中,以满足菌体的生长需求。当 OD_{600} 达到 15 时,一次性加入终质量浓度为 10 g/L 的甘氨酸。当 OD_{600} 为 50 时,降低发酵温度至 32 ℃,同时加入诱导培养基以诱导重组蛋白质的表达,此时发酵进入第三阶段,即诱导阶段。在此阶段中,随着诱导剂的添加,发酵液中重组蛋白质逐渐积累。整个发酵过程中,通过转速和通气量控制发酵液中的 DO 为 30%,通过氨水的添加控制发酵液中的 pH 为 7.0。

1.4 方法

1.4.1 共表达 BLA 和角质酶载体和菌株的构建 分别用限制性内切酶 NcoI 和 HindIII 同时对质粒 pET20b-amy 和 pETDuet-cutinase 进行双酶切,用 DNA 胶回收试剂盒回收相应的基因片段,然后将淀粉酶基因 amy 和含有角质酶基因的共表达载体 pETDuet-cutinase 用 T4 连接酶在 16 ℃连接过夜。将连接产物转化 *E. coli* JM109 并涂布至含有 Kan 抗性的 LB 平板上,挑取阳性克隆至含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,抽提质粒,经 NcoI 和 HindIII 双酶切验证正确的重组质粒送至测序公司进行基因测序。将测序正确的质粒转化表达宿主 *E. coli* BL21(DE3),构建能共表达 BLA 和角质酶的重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/ pETDuet-cutinase-amy。

1.4.2 菌体浓度的测定 吸取一定量的发酵液,将发酵液用去离子水稀释至适当的倍数,使得稀释液在 600 nm 下的吸光值在 0.2~0.8 之间,菌体浓度 OD_{600} 则为吸光值乘以稀释倍数。

1.4.3 酶活力的测定 吸取一定量的发酵液,在 12 000 r/min、4 ℃下离心 5 min,吸取离心后的上清液,测量上清液中的重组 α-淀粉酶活力即为胞外 α-淀粉酶活力。吸取一定量的发酵液,将发酵液用 20 mmol/L、pH 6.0 的磷酸缓冲液稀释菌体浓度 OD_{600} 至 5.0,将稀释后的发酵液采用超声破壁的方法破碎细胞,随后将经过超声破壁的发酵液在 12 000 r/min、4 ℃条件下离心 5 min,吸取离心后的上清液,此上清液中所含的 α-淀粉酶活力即为总 α-淀粉酶活力。

α-淀粉酶酶活力测定的条件为:底物为 1 mL 1%的可溶性淀粉,加入 0.9 mL 的磷酸缓冲液(pH 6.0、20 mmol/L)混匀,置于 70 ℃恒温水浴锅中预热 3 min,加入 100 μL 稀释好的酶液,在 70 ℃下反应 5 min,之后向反应体系中加入 3 mL DNS 溶液终止反应。将反应体系置于 100 ℃下处理 7 min 后,立刻将反应体系放入冰水中降温。随后将体系定容至 15 mL,在 540 nm 下测定吸光值,计算酶活力。用 DNS 法[6]制作标准曲线时所用的还原糖为葡萄糖。在分析条件下,α-淀粉酶每分钟降解淀粉生成 1 μmol 的还原糖所需的酶量定义为一个酶活力单位。角质酶活力的测定参照文献[5]。

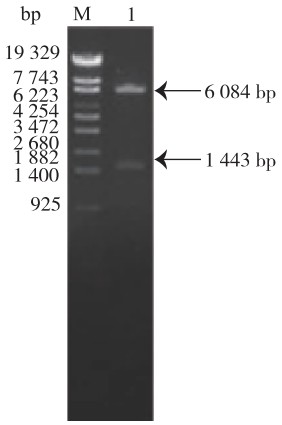
1.4.4 蛋白质浓度的测定和 SDS-PAGE 分析 以牛血清蛋白质为标准蛋白样品制作标准曲线,采用 Bradford 方法测定样品中蛋白质质量浓度[7]。聚丙烯酰胺凝胶电泳胶的制备采用碧云天蛋白电泳试剂盒进行操作,分离胶质量浓度 12 g/dL,浓缩胶质量浓度 5 g/dL。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

将含有 α-淀粉酶基因的重组质粒 pET20b-*amy* 和含有角质酶基因的重组质粒 pETDuet-*cutinase* 用 NcoI 和 HindIII 进行双酶切,胶回收相应的目的基因并将其进行连接,连接产物转化 *E. coli*

JM109,挑取单克隆提取质粒用 Nco I 和 Hind III 双酶切验证,结果见图 1。琼脂糖凝胶电泳显示约为 6 084 bp 和 1 443 bp 的两条片段,说明同时含有 α-淀粉酶基因和角质酶基因的重组质粒构建成功,命名为 pETDuet-*cutinase-amy*。



M:DNA 相对分子质量标准;1:pETDuet-*cutinase-amy* NcoI 和 HindIII 双酶切产物

图 1 pETDuet-*cutinase-amy* 双酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis ofpETDuet-*cutinase-amy* digested by NcoI and HindIII

2.2 共表达菌株和单表达菌株的发酵对比

将构建好的重组质粒 pETDuet-*cutinase-amy* 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 构建共表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pETDuet-*cutinase-amy*。首先在摇瓶水平上对共表达菌株和单表达菌株的发酵产酶情况进行对比,结果见图 2。从图 2(a)可以看出,在相同的培养条件下,两种菌株的菌体生长趋势相似。随着发酵的进行,两种菌株的胞外 α-淀粉酶活力逐渐升高。当发酵至 28 h 时,共表达菌株的胞外 α-淀粉酶活力达到最高,为 2.21×10^3 U/mL。而单表达菌株的胞外 α-淀粉酶活力在 40 h 达到最大,为 2.14×10^3 U/mL。尽管两种菌株所产胞外 α-淀粉酶活力相差不大,但共表达菌株在单位时间内产酶量更大,生产强度更高,具有一定的优势。

进一步在 3 L 发酵罐水平上对比两种菌株的生长和产酶情况,采用 37 ℃生长、32 ℃诱导,乳糖的诱导强度为 0.2 g/(L·h),结果见图 3。共表达菌株和单表达菌株在 3 L 罐中的生长趋势相似,可能由于同时表达两种外源蛋白质对菌体代谢有细微影响,共表达菌株的最高菌浓比单表达菌株的稍低(图 3(a))。尽管如此,共表达菌株和单表达菌株的胞外酶活力有着较大的区别。从图 3(b)可以看出,共表达菌株的胞外 α-淀粉酶活力在 44 h 达到最高,为 2.87×10^4 U/mL。而单表达菌株的最高胞外 α-淀粉酶活力为 1.69×10^4 U/mL(47 h)。共表达菌株胞外最高 α-淀粉酶活力为单表达菌株的 1.7 倍。从发酵总酶活的数据可知,共表达菌株的总酶活也比单表达菌株的高(图 3(c))。因此,共表达菌株在产酶方面比单表达菌更加具有工业应用前景。为了更大限度的提高胞外 α-淀粉酶的产量,作者对影响大肠杆菌产酶的因素进行优化。

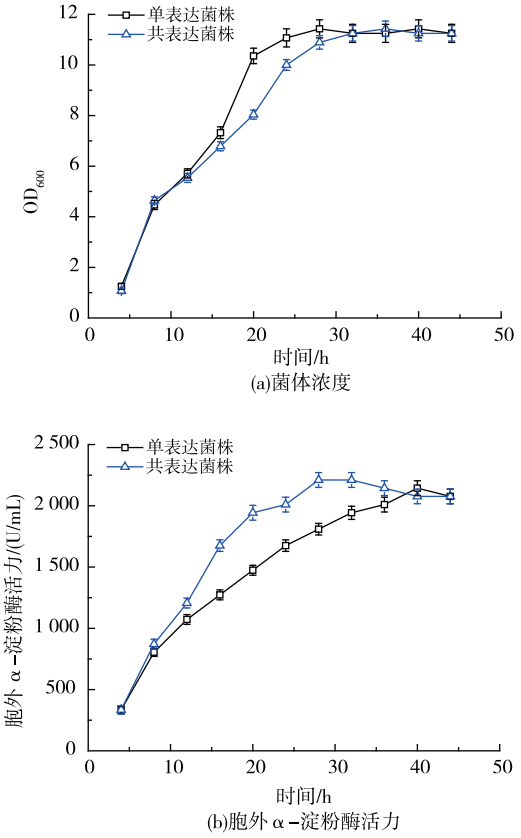


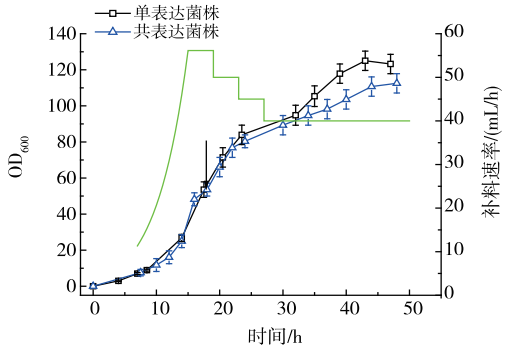
图 2 共表达菌株与单表达菌株的摇瓶发酵趋势对比图

Fig. 2 Comparison of time profiles for fermentation in shake flask between co-expression system and individual expression system

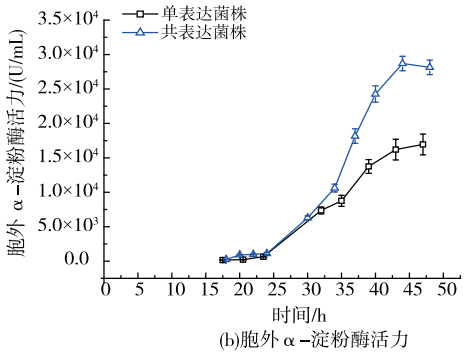
2.3 诱导温度对共表达菌株产酶的影响

诱导温度对大肠杆菌表达外源蛋白质有着重要的影响[8-9]。一般来说,较低的诱导温度有利于抑制包涵体的生成,从而提高具有生物活性外源蛋白质的产量[10]。为了优化诱导温度,作者在 25、32、37 ℃三种诱导温度条件下检测共表达菌株生长和产酶的情况。从图 4 可以看出,诱导温度为37 ℃时,菌株的生长情况最好,在此条件下菌体浓度 OD_{600} 最高

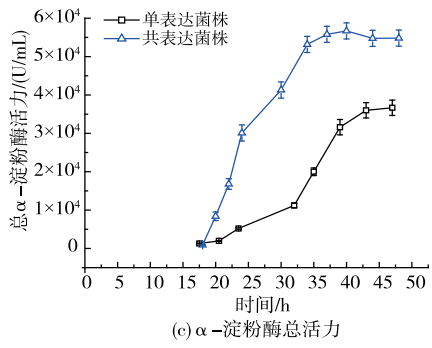
为 116.1。然而,在此条件下的最高胞外 α-淀粉酶和总 α-淀粉酶活力均为三个温度条件下的最低值(1.50×10⁴、2.86×10⁴ U/mL)。当诱导温度为 32 ℃时,此时的胞外和总 α-淀粉酶活力均为最高(2.87×10⁴、5.47×10⁴ U/mL),分别为在 25 ℃诱导时的 1.43 和 1.44 倍。在 25 ℃条件下诱导时,较低的诱导温度可能导致外源蛋白合成速率降低,从而导致重组 α-淀粉酶活力减少。因此,选取 32 ℃为共表达菌株的最适诱导温度。



图中绿色实线为补料速率,箭头表示开始诱导时间
(a)菌体浓度



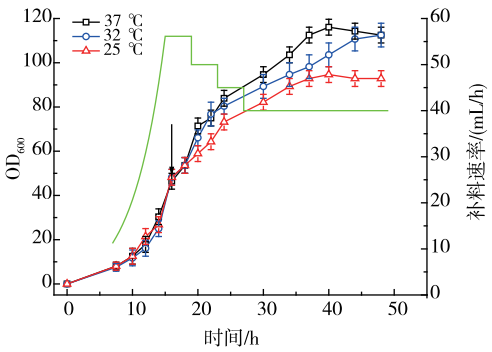
(b)胞外 α-淀粉酶活力



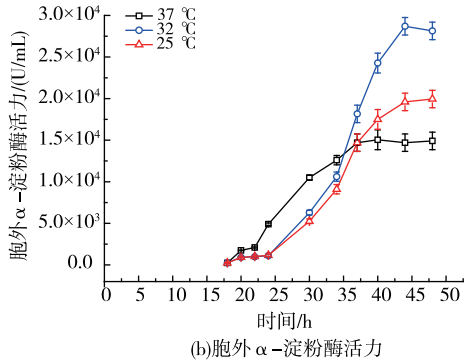
(c) α-淀粉酶总活力

图 3 共表达菌株和单表达菌株在 3 L 罐上的发酵趋势对比图

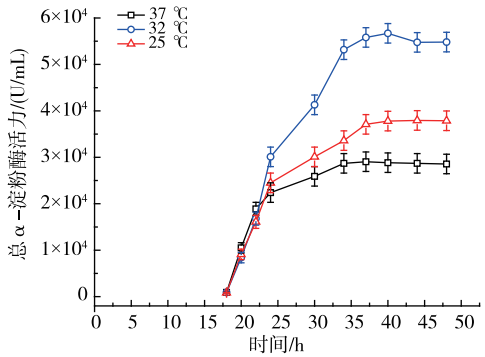
Fig. 3 Comparison of time profiles for fermentation in 3 L fermentor between co-expression system and individual expression system



图中绿色实线为补料速率,箭头表示开始诱导时间
(a)菌体浓度



(b)胞外 α-淀粉酶活力



(c) α-淀粉酶总活力

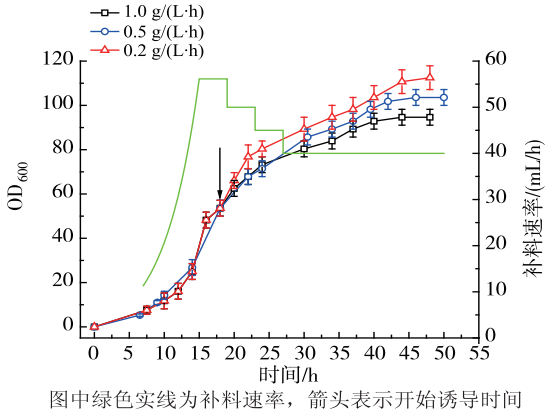
图 4 不同诱导温度条件下共表达菌株的发酵过程曲线图

Fig. 4 Comparison of time profiles for fermentation of co-expression system under different temperatures

2.4 乳糖诱导强度对共表达菌株产酶的影响

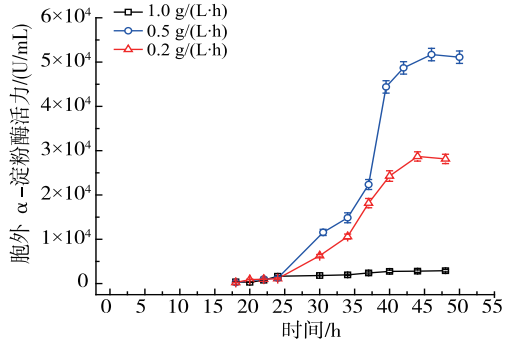
充足的诱导强度是大肠杆菌表达过量重组的必要条件[10]。然而,诱导剂的添加必须兼顾菌体的生长和重组蛋白质的合成,防止生成大量的包涵体[11]。作者将对乳糖的诱导强度进行优化,乳糖添加速率分别在 1.0、0.5、0.2 g/(L·h)的条件下检测共表达菌株的生长及产酶的情况,结果见图 5。当乳糖的诱导强度为 1.0 g/(L·h)时,此时菌体的最终浓度 OD_{600} 为 94.6,随着诱导强度的降低,菌体的最终浓度逐

渐升高,这可能是由于高诱导强度对菌体的生长代谢有压力,从而抑制了菌体的生长。在乳糖诱导强度为 1.0 g/(L·h)时,菌体产酶受到明显的抑制,α-淀粉酶总酶活及胞外酶活均为最低。当乳糖的诱导强度为 0.5 g/(L·h)时,此时的 α-淀粉酶活力有着明显的提升,在此条件下,最高 α-淀粉酶总活力和胞外 α-淀粉酶活力分别达到 9.70×10^4、5.17×10^4 U/mL,胞外酶活占总酶活的比例为 53.3%。随着诱导强度的进一步降低,共表达菌株所产 α-淀粉酶活力有所下降。因此,选取乳糖诱导强度为 0.5 g/(L·h)。

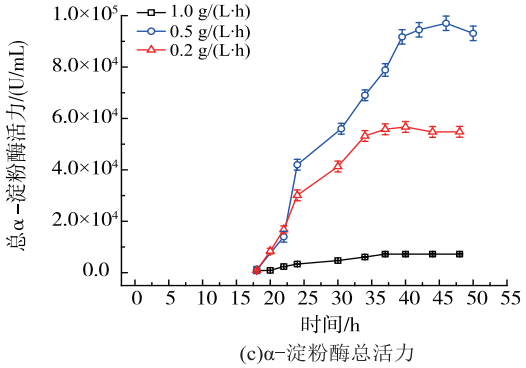


图中绿色实线为补料速率，箭头表示开始诱导时间

(a)菌体浓度



(b)胞外α-淀粉酶活力



(c)α-淀粉酶总活力

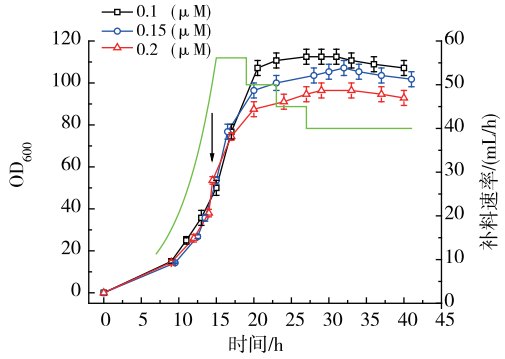
图 5　不同乳糖诱导强度下共表达菌株的发酵过程曲线图

Fig. 5　Comparison of time profiles for fermentation of co-expression system under different lactose concentrations

2.5　IPTG 和乳糖同时诱导提高共表达菌株胞外 α-淀粉酶产量

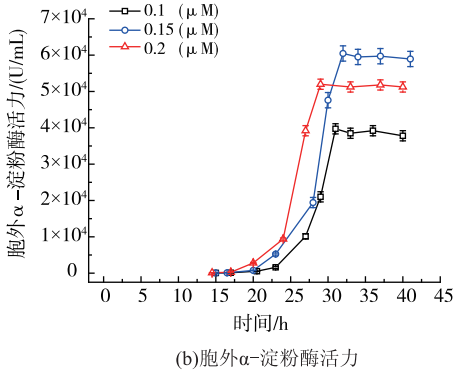
由于稳定期的大肠杆菌细胞膜将变得更加的刚性[12],并不适合大肠杆菌将重组蛋白质分泌至胞外。因此,在稳定期前过量表达角质酶,尽可能多的水解细胞膜上的磷脂,从而提高膜透性,可能对提高胞外 α-淀粉酶活力有促进作用。诱导剂 IPTG 相对于乳糖能更快的进入大肠杆菌细胞内诱导重组蛋白质的表达[13]。因此,作者在诱导前期添加不同浓度的 IPTG 来加强角质酶的表达,同时持续添加 0.5 g/(L·h)乳糖来保证诱导强度。

图 6 显示,在 0.1、0.15、0.2 μmol/L IPTG 和 0.5 g/(L·h)乳糖诱导时,共表达菌株的最高菌浓分别为 112.5、107.1、96.4 g/L。在两种诱导剂共同的作用下,共表达菌株的胞外 α-淀粉酶活力比单独诱导时有着明显的增加。在 0.1 μmol/L IPTG 和 0.5 g/(L·h)乳糖的诱导条件下,发酵进行 31 h 时,胞外 α-淀粉酶活力最高可达 3.97×10^4 U/mL。当 IPTG 的浓度增加至 0.15 μmol/L 时,胞外 α-淀粉酶活力在发酵 32 h 时达到 6.05×10^4 U/mL,此时目的蛋白质质量浓度为 8.92 g/L。随后继续提高 IPTG 的浓度并不能促进

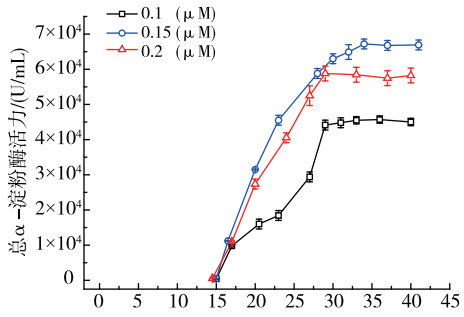


图中绿色实线为补料速率，箭头表示开始诱导时间

(a)菌体浓度



(b)胞外α-淀粉酶活力

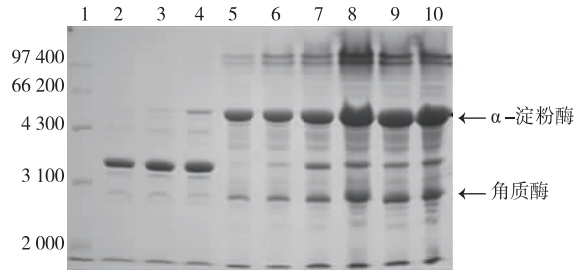


(c)α-淀粉酶总活力

图 6 不同浓度 IPTG 结合 0.5 g/(L·h) 乳糖诱导条件下的共表达菌株发酵过程曲线图

Fig. 6 Comparison of time profiles for fermentation of co-expression system under different IPTG concentrations and 0.5 g/(L·h) lactose

胞外 α-淀粉酶活力的提升。蛋白质电泳显示,随着发酵的进行,胞外 BLA 逐渐积累,见图 7。与总酶活的数据对比可知,IPTG 和乳糖共同诱导时,胞外 α-淀粉酶活力占总酶活的比例有着较大的提升。在 0.1、0.15、0.2 μmol/L IPTG 和 0.5 g/(L·h) 乳糖诱导时的胞外分泌比例分别为 88.6%、93.2%和 88.4%,见表 1。



Lane1:蛋白质标注;lanes 2~10:发酵15、17、20、23、28、30、32、37、41 h 样品

图 7 共表达菌株 3 L 发酵罐发酵过程中胞外上清液 SDS-PAGE 蛋白质电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of extracellular α-amylase and cutinase in *E. coli* C induced with 0.15 μmol/L IPTG and 0.5 g/(L·h) lactose

表 1 共表达菌株在不同发酵条件下的发酵数据对比表

Table 1 Comparison of parameters for recombinant α-amylase production in *E. coli* C in fermenter

诱导温度/℃	乳糖诱导强度/(g/(L·h))	IPTG 浓度/(μmol/L)	菌体浓度 OD_{600}	胞外 α-淀粉酶活力/($\times10^4$ U/mL)	总 α-淀粉酶活力/($\times10^4$ U/mL)	分泌比例/%
37	0.2	0	116.1±3.8	1.50±0.12	2.86±0.21	52.3±1.1
32	0.2	0	112.5±4.1	2.87±0.18	5.47±0.21	52.5±1.2
25	0.2	0	94.6±3.5	1.99±0.11	3.79±0.24	52.8±1.1
32	1.0	0	94.0±3.2	0.29±0.03	0.72±0.06	40.3±1.1
32	0.5	0	103.6±3.5	5.17±0.23	9.70±0.41	53.3±1.2
32	0.5	0.1	112.5±4.5	3.97±0.21	4.48±0.19	88.6±1.5
32	0.5	0.15	107.1±3.7	6.05±0.31	6.49±0.32	93.2±1.6
32	0.5	0.2	96.4±3.0	5.20±0.21	5.88±0.31	88.4±1.5

为了验证 IPTG 的添加有助于提高角质酶的表达,作者在 0.5 g/(L·h) 乳糖诱导和 0.15 μmol/L IPTG 与 0.5 g/(L·h)乳糖共同诱导时的角质酶总酶活进行测定,结果见图 8。从图 8 可以看出,当在 0.15 μmol/L IPTG 和 0.5 g/(L·h)乳糖共同诱导条件下,角质酶的最高酶活力为 300 U/mL(34 h)。而在 0.5 g/(L·h)乳糖诱导时,角质酶在相同发酵时间下的酶活力为 53 U/mL(34 h),仅为 IPTG 和乳糖共同诱导时的 17.6%,并且在此条件下的最高角质酶活力为 170 U/mL。而角质酶酶活的提高可能更多的水解大肠杆菌细胞膜上磷脂,从而增加细胞膜透性,进而提高 BLA 的分泌效率。

3 讨 论

地衣芽孢杆菌来源的耐高温 α-淀粉酶在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、毕赤酵母等表达宿主中的重组表达均有研究,然而国内的大部分研究主要集中在重组蛋白质的性质研究和重组菌的摇瓶发酵优化[14-16]。本研究将经过分子改造的来源于地衣芽孢杆菌 α-淀粉酶基因与嗜热放线菌角质酶基因在 *E.coli* BL21

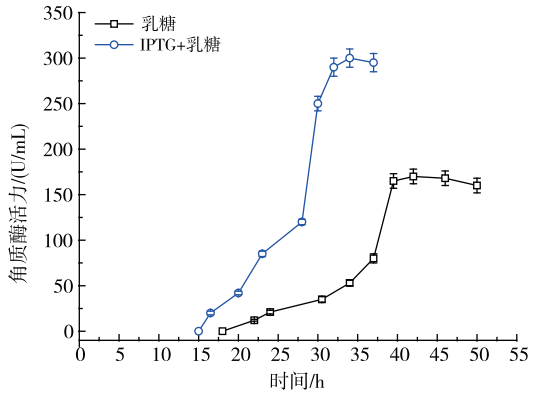


图 8　在不同诱导条件下角质酶总活力的对比图

Fig. 8　Comparison of the time profiles for total cutinase activity induced with 0.5 g/(L·h) lactose, 0.15 μmol/L IPTG and 0.5 g/(L·h) lactose in *E. coli* C

(DE3) 中进行共表达，构建了共表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pETDuet-*cutinase*-*amy*，并将共表达菌株与单独表达 α-淀粉酶菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET20b-*amy* 进行摇瓶和 3 L 罐的初步发酵对比。结果显示，共表达菌株在胞外表达重组 α-淀粉酶具有明显的优势。尽管同时表达两种外源蛋白质对大肠杆菌宿主的代谢产生更高的压力，但是角质酶的表达可以增加大肠杆菌细胞膜透性，从而使得重组蛋白质更加高效的分泌至胞外，减少细胞内重组蛋白质的过量积累。这种情况下可能进而减少包涵体的形成，从而提高具有活性外源蛋白质的产量[4]。因此，大肠杆菌内 BLA 与角质酶的共表达可以提高 BLA 的产量。随后，作者对影响大肠杆菌表达重组蛋白质的因素进行优化。在优化诱导温度的研究中发现，37 ℃条件下对共表达菌株的生长有益，然而在此条件下有活性的重组 α-淀粉酶却很少，这可能是由于在较高温度时，重组蛋白质快速表达，大部分重组蛋白质来不及折叠而生成大量的包涵体[17]。在 25 ℃低温条件下，虽然低温有利于重组蛋白质的折叠，然而低温不利于重组蛋白质的快速表达[18]。32 ℃下可以兼顾重组蛋白质的合成速率和折叠效率，从而提高有活性重组 α-淀粉酶的表达量。

合适的诱导强度是过量表达重组蛋白质的必要条件[19]。在乳糖诱导强度的优化中发现，在持续添加 0.5 g/(L·h)乳糖时，共表达菌株发酵产生的总 α-淀粉酶活力和胞外 α-淀粉酶活力均最高。尽管在此条件下的胞外 α-淀粉酶活力比未优化前有着较大程度的提高，然而胞外 α-淀粉酶活力仅占总活力的 53.3%，细胞内仍有大量的重组 α-淀粉酶未分泌至胞外。IPTG 和乳糖均可以通过乳糖启动子诱导重组蛋白质的表达[20]。IPTG 可以直接进入大肠杆菌细胞内，并直接结合到 lac 阻遏蛋白，使得外源蛋白质表达[21]。而乳糖首先需要在 lac 透性酶的帮助下进入大肠杆菌细胞内，随后在 β-半乳糖苷酶的作用下转变成异乳糖，进而结合 lac 阻遏蛋白以诱导外源蛋白质的表达[12]。因此，相较于乳糖，IPTG 可以迅速诱导大肠杆菌外源蛋白质表达。当在开始诱导阶段添加一定浓度的 IPTG 并持续添加乳糖，共表达菌株中的重组 α-淀粉酶和重组角质酶都得到迅速表达。由于角质酶具有一定的磷脂酶活性，角质酶的快速表达可以更好的破坏大肠杆菌细胞膜，从而增强大肠杆菌细胞膜透性，提高胞外 α-淀粉酶活力。

4　结　语

构建了能同时表达 α-淀粉酶和角质酶的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pETDuet-*cutinase*-*amy*，在与单独表达 α-淀粉酶的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET20b-*amy* 的摇瓶和 3 L 罐的初步发酵对比可知，共表达菌株在胞外表达重组 α-淀粉酶有着明显的优势。对共表达菌株的诱导条件进行优化，结果显示，在诱导温度为 32 ℃，诱导剂为 0.15 μmol/L IPTG 和 0.5 g/(L·h)乳糖共同诱导时，胞外 α-淀粉酶活力可达 6.05×10^4 U/mL，胞外 α-淀粉酶蛋白质质量浓度为 8.92 g/L，胞外分泌比例为 93.2%，实现了重组 α-淀粉酶的胞外过量表达，在工业生产上具有较好的应用前景。

参考文献：

[1] GUPTA R, GIGRAS P, MOHAPATRA H, et al. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective [J]. **Process Biochemistry**, 2003, 38(11): 1599-1616.

[2] LI Z, DUAN X, CHEN S, et al. Improving the reversibility of thermal denaturation and catalytic efficiency of *Bacillus licheniformis* α-amylase through stabilizing a long loop in domain B[J]. **Plos One**, 2017, 12(3): e0173187.

[3] SELLECK,W.,and TAN,S. Recombinant protein complex expression in *E.coli*[J]. **Current Protocols in Protein Science**,2008,52(1):1-21.

[4] CHOI J H,LEE S Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2004,64(5):625-635.

[5] SU L,XU C,WOODARD R W,et al. A novel strategy for enhancing extracellular secretion of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2013,97(15):6705-6713.

[6] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Analytical Chemistry**,1959,31(3):426-428.

[7] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**,1976,72(12):248-254.

[8] FANG S,LI J,LIU L,et al. Overproduction of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Escherichia coli* by a two-stage glycerol feeding approach[J]. **Bioresource Technology**,2011,102(22):10671-10678.

[9] PINSACH J,LOPEZ-SANTIN M J. Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures[J]. **Enzyme & Microbial Technology**,2008,43(7):507-512.

[10] DUAN X,CHEN J,WU J. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes[J]. **Bioresource Technology**,2013,146C(10):379-385.

[11] LILIE H,SCHWARZ E,RUDOLPH R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*[J]. **Current Opinion in Biotechnology**,1998,9(5):497-501.

[12] SHOKRI A,SANDEN A,LARSSON G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2003,60(6):654-664.

[13] WENG Y P,HSU F C,YANG W S,et al. Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers[J]. **Enzyme & Microbial Technology**,2006,38(3):465-469.

[14] LI Jinxia,CAI Heng,LU Fuping,et al. Cloning expression of heat-stable α-amylase gene from *Bacillus licheniformisin* in *E. coli* [J]. **Food and Fermentation Industries**,2004(03):70-73.(in Chinese)

[15] WANG Hongge,LUO Jinxian. Inducible expression of α-amylase gene of *Bacillus licheniformisin* in *Bacillus subtilis* [J]. **Acta Microbiologica Sinica**,1997(02):101-106.(in Chinese)

[16] DU Cheng,MENG Xianmei,LU Shiying,et al. Expression and activity analysis of recombinant thermostable α-amylase from *Bacillus licheniformisin* in *Pichia pastoris*[J]. **Food Science and Technology**,2010,35(08):44-48.(in Chinese)

[17] SU L,HUANG Y,WU J. Enhanced production of recombinant *Escherichia coli* glutamate decarboxylase through optimization of induction strategy and addition of pyridoxine[J]. **Bioresource Technology**,2015,198:63-69.

[18] LEE I Y,KIM M K,LEE S B. Effect of induction temperature on the P_L promoter controlled production of recombinant human interleukin-2 in *Escherichia coli*[J]. **Journal of Microbiology & Biotechnology**,1992,2(1):26-34.

[19] LI Yongxian,ZHENG Feiyun,LI Qi,et al. Optimization of fermentation conditions of recombinant *E. coli* BL21(DE3)-pET28a (+)-bgl production β-glucanase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2009,28(02):250-255.(in Chinese)

[20] KILIKIAN B V,SUAREZ I D,LIRIA C W,et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction[J]. **Process Biochemistry**,2000,35(9):1019-1025.

[21] DONOVAN R S,ROBINSON C W,GLICK B R. Review:optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**,1996,16(3):145-154.