球毛壳菌 α-葡聚糖酶的异源表达、纯化及特性表征

顾莉莉[1,2]，周楠迪[1,2]，田亚平*[1,2]

（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 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：利用毕赤酵母密码子偏好性优化合成球毛壳菌 α-葡聚糖酶基因，并在毕赤酵母 GS115 中实现异源表达。通过高拷贝筛选和摇瓶发酵条件的单因素优化，重组 α-葡聚糖酶的酶活力由初始的 2.692 U/mL 提高至 47.915 U/mL。选择 Hitrap Q HP 和 Hitrap SP HP 的双步层析分离将发酵粗酶液纯化至电泳纯，纯化倍数 40.83，比活达 277.61 U/mg，回收率为 24.15%。纯酶最适温度和 pH 分别为 60 ℃和 5.5。在 20~50 ℃和 pH 为 4.5~8.5 范围内稳定性良好，浓度为 10 mmol/L 的 Fe^{2+}对酶有激活作用，Cu^{2+}浓度(0.1~10 mmol/L)越高对酶的抑制作用越强。酶动力学实验发现该重组酶对高相对分子质量的底物亲和力更高，葡聚糖 T2000 为该酶的最适底物。

关键词：α-葡聚糖酶；毕赤酵母；离子交换；电泳；特性表征

中图分类号：Q 939.97　**文章编号：**1673-1689(2021)11-0030-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.11.004

Heterologous Expression, Purification and Characterization of Alpha-Glucanase from *Chaetomium globosum*

GU Lili[1,2]，*ZHOU Nandi*[1,2]，*TIAN Yaping*[*1,2]

（1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China）

Abstract: In this study, α-glucanase derived from *Chaetomium globosum* was synthesized and optimized according to the codon preference of *Pichia pastoris*, and then successfully heterologous expressed in *Pichia pastoris* GS115. Through the high-copy screening and single-factor optimization of shake flask fermentation, the enzyme activity of recombinant α-glucanase was increased from 2.692 U/mL to 47.915 U/mL. The crude enzyme was purified to electrophoretic purity by two-step chromatography through Hitrap Q HP and Hitrap SP HP. The purification factor reached 40.83, with the recovery of 24.15%. And the specific activity of purified enzyme reached 277.61 U/mg. The optimal reaction temperature and pH were 60 ℃ and 5.5, respectively. The enzymatic activity kept stable within 20~50 ℃ and pH 4.5~8.5. The presence of 10 mM Fe^{2+} activated the enzyme, whereas 0.1~10 mM Cu^{2+} inhibited the enzyme. The higher concentration of Cu^{2+}, the stronger inhibition of enzyme. Affinity study indicated that the recombinant enzyme had the higher affinity towards substrates with higher molecular weight. Dextran T2000 was the optimal substrate of the enzyme.

Keywords: α-Glucanase, *Pichia pastoris*, ion exchange, electrophoretic, characterization

收稿日期：2020-09-19

基金项目：国家自然科学基金项目(31601558)。

*通信作者：田亚平(1964—)，女，博士，教授，主要从事微生物发酵与应用生物化学研究。E-mail：biochem@jiangnan.edu.cn

α-葡聚糖酶，又称右旋糖酐酶（α-1，6 glucan-6 glucanohydrolase，EC 3.2.1.11），是一种可特异性催化 α-葡聚糖中 α-1，6-糖苷键的水解酶。该酶主要来源于真菌和细菌。随着研究的日益深入，该酶的应用领域被广泛挖掘[1]。在我国，该酶主要应用于制糖、医药、日化等领域[2-8]。各行业对该酶的需求日益迫切，但其产量目前仍然偏低，无法满足各个领域的需求。

近几年的有关研究一直以提高该酶的产量为目标。2014 年，王雅洁等[9]从土壤中筛选一株能产生右旋糖酐酶的拟青霉（Paecilomyces），发酵液上清中的酶活力最高达 19.34 U/ml。2019 年，王乐怡[10]将细丽毛壳菌来源的 α-葡聚糖酶基因在 *Bacillus subtilis* WB800 中表达，并构建了含有双 p43 启动子的表达框后，其提高至 14.22 U/mL。同年，杨柳通过结合常压和室温等离子体和乙基甲基砜诱变球毛壳原始菌，使得 α-葡聚糖酶的产量高达 824.73 U/mL[11]。2018 年，Wakil 等人从土壤和蜂蜜中分离出产 α-葡聚糖酶能力较强的短青霉 BG8、尖孢镰刀菌 BG4 和交替链霉菌 DD5，其活性进一步提高[12]。由于大多数原始菌的产量均较低，通过异源表达提高酶产量[13-14]是发展趋势。近年来的研究中，毕赤酵母表达系统已广泛地被选择用于表达外源蛋白质[15-17]，该系统操作方便、培养基成分简明且遗传性状稳定，因此作者选择将球毛壳菌来源的 α-葡聚糖酶在毕赤酵母 GS115 中进行表达，通过优化发酵条件等手段[18-25]，以期达到较高的表达水平。

不同来源的 α-葡聚糖酶的基本酶学性质不同。2017 年，杨帆[26]研究了圆弧青霉菌产右旋糖酐酶的最适催化温度和 pH 分别为 40 ℃和 6.0，在偏碱性的条件下酶活保留效果较好；黎志德等[27]研究的毛壳菌来源的 α-葡聚糖酶最适反应温度和 pH 为 60 ℃和 5.5；吴敏等[28]研究了重组后的刺孢青霉来源右旋糖酐酶的最适催化温度和 pH 分别为 35 ℃和 5.0，与其原始酶最适值一致；张宇琪[29]筛选到的一株嗜松青霉菌所产右旋糖酐酶的最适催化条件为45 ℃、pH 为 6，Zn^{2+}、Cu^{2+}强烈抑制其酶活性。近年关于该酶酶学性质的研究逐渐增多，寻找稳定性良好的 α-葡聚糖酶也成为目前研究的主要方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）GS115、大肠杆菌 JM109、质粒 pPIC9k：均为作者所在实验室保藏。

1.1.2 培养基 LB、YPD、BMGY、BMMY、MD。

1.1.3 试剂与仪器 限制性内切酶（*EcoR* I、*Not* I、*Sac* I）、Primer STAR、DNA Marker：购自大连宝生物公司；质粒抽提试剂盒、DNA Marker 等：购自上海生工；葡聚糖 T2000：购自卡迈舒生物科技公司；无氨基酵母氮源、遗传霉素、生物素：购自 Bio Basic 公司；其他常规试剂均为分析纯：购自上海国药集团。

PCR 仪 TC-25/H：BIOER 公司产品；电转仪：Enppdorf 公司产品；高速冷冻离心机 himac CR22G：日立（HITACHI）公司产品；全温摇瓶柜 HYL-A：强乐实验设备有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 α-葡聚糖酶基因的优化与合成 将本实验室解析出的 α-葡聚糖酶基因序列（NCBI 登录号：MH122516.1），根据 *P. pastoris* 的密码子偏好性优化后由上海生工合成。

1.2.2 引物设计 本实验所用引物使用 SnapGene 设计，交由上海生工合成，序列见表 1。

表 1 本实验扩增 DNA 所用到的引物

Table 1 Primers used in this study to amplify DNA

引物	序列（5′-3′）
P1	CTGAAGCTTACGTAGATGTTTTCTGCTGTTCTGTTGG
P2	GTCTAAGGCGAATTAATTCGCTTATCTAATAACCCATTGACCCCA
P3	CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAG
P4	GAATCTAGCAAGACCGGTCTTCTC

下划线部分为同源序列。

1.2.3 工程质粒 pPIC9k-DEX 的构建及鉴定　质粒 pPIC9k 由质粒抽提试剂盒获得并用限制性内切酶(*EcoR* I、*Not* I)处理;无缝克隆试剂盒连接载体与目的基因（引物 P1 和 P2 扩增所得）转化大肠 JM109 后挑取长势良好的单菌落进行菌落 PCR(菌落 PCR 引物为 P3 和 P4)验证。验证结果正确的送上海生工测序。

1.2.4 工程菌的鉴定及高拷贝筛选　将测序结果无误的单菌落培养后抽提 pPIC9k-DEX 工程质粒,限制性内切酶 *Sac* I 将其处理并用 DNA 纯化试剂盒进行回收,电击转化毕赤酵母 GS115。挑取单菌落在 95 ℃处理 5 min 后进行菌落 PCR 验证[24];转化子依次接种至 G418 质量浓度为 1~6 mg/mL 的 YPD 平板进行高拷贝筛选。甲醇诱导摇瓶发酵测定初始重组菌和不同 G418 质量浓度下正常生长的重组菌的表达 α-葡聚糖酶的情况。

1.2.5 生物量的测定　比浊法。取适量菌液离心弃上清液,加入等体积的纯水吹吸混匀,对照组为纯水;紫外可见光分光光度计 600 nm 处测定吸光值。以时间为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制重组菌的生长曲线。

1.2.6 摇瓶发酵条件优化　诱导起始时间:根据生长曲线将起始诱导时间确定为 18、20、22、24、26、28 h;诱导温度:将诱导温度梯度设置为 32、30、28、26、24、22、20 ℃;诱导甲醇体积分数:选取诱导甲醇体积分数梯度为 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%;诱导甲醇添加时间:将甲醇添加时间设定为每隔 12、24、36 h;摇床转速:将摇床转速分别设置为 190、210、230、250 r/min;诱导初始 pH:将发酵培养基初始 pH 梯度设置为 4~10;山梨醇添加量:选取山梨醇添加量为 1~6 g/L;以上均每隔 24 h 测定各组发酵液上清中的酶活。

1.2.7 重组 α-葡聚糖酶酶活的测定　DNS 法[29]。重组 α-葡聚糖酶的酶活力用还原糖含量表示:酶活定义:50 ℃下,重组 α-葡聚糖酶每分钟催化质量分数 1%的底物(葡聚糖 T2000)生成 1 μmol 还原糖所需酶量,U/mL 表示[11]。

1.2.8 重组 α-葡聚糖酶的纯化及 SDS-PAGE 鉴定　阴离子交换层析:粗酶液经 0.22 μm 过滤膜过滤,用透析袋装好置于 pH 7.4,20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(A 液)中 4 ℃下透析 12 h 后作为层析的样品溶液。Hitrap Q HP 层析柱(5 mL)进行分离纯化。A 液平衡柱床后样品泵每次进样量 30 mL,B 液(pH 7.4,含 1 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液)在 5 mL/min 的流量下进行洗脱。收集器收集目标蛋白质并测定总酶活和蛋白质浓度。

阳离子交换层析:将阴离子交换层析获得的目标蛋白质样品置于 pH 4.7、20 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液(A 液)中 4 ℃下透析 10 h,作为阳离子交换层析的样品液。Hitrap HP SP 层析柱(5 mL)用 A 液平衡后样品泵每次进样量 15 mL,B 液（pH 4.7,20 mmol/L HAc-NaAc,1 mol/L NaCl)分阶段洗脱,管收集目标蛋白质并测定每管的酶活与蛋白质浓度。

SDS-PAGE 电泳验证条带大小以及纯度,并计算纯化倍数、比酶活和回收率。

1.2.9 重组 α-葡聚糖酶的酶学特性　重组 α-葡聚糖酶的最适温度:设置温度梯度 20~70 ℃(间隔 5 ℃),将纯化后的酶液在不同温度下与底物反应,测定酶活力;热稳定性:将同样的酶液置于每个温度梯度下分别保温 1 h 和 3 h,同样的方法测定酶活力。结果以最高酶活的百分比表示;重组 α-葡聚糖酶的 pH:设置 pH 梯度 3~10(间隔 0.5),测定不同 pH 条件下的酶活力。pH 稳定性:将同样的酶液分别置于上述 pH 梯度缓冲液中,分别在室温(25 ℃)下放置 6 h 和 4 ℃下放置 24 h,测定各条件下的酶活力。结果以最高酶活的百分比表示;金属离子的影响:分别配制含有不同金属离子的质量分数 1% 底物溶液,至终浓度分别为 0.1、1、10 mmol/L。测定各条件下的酶活力,结果以不添加金属离子条件下的酶活力为 100%表示;动力学方程参数的测定:乙酸盐缓冲液配制质量浓度为 1.5、5、7、10、15、20 mg/mL 的 T20、T40、T70 和 T2000 的底物溶液,纯酶液与这些底物分别反应并测定酶活力。线性拟合法作图并计算 K_m 及 V_{max} 值。

2 结果与讨论

2.1 α-葡聚糖酶基因的密码子优化结果

经序列比对后发现,α-葡聚糖酶基因优化前和优化后序列一致性为 73.38%。优化后的序列通过对低频密码子替换,使相对适用性高(91%~100%)的密码子从 29%提高到 76%,而使用频率较低(<50%)的密码子仅剩 3%。最终使该基因的 CAI(密码子适应指数)从 0.56 提高到 0.91(CAI 为 0.8~1.0 时被认为有利于高表达)。

2.2 工程质粒 pPIC9k-DEX 的构建及转化子的阳性鉴定

pPIC9k -DEX 的工程质粒测序结果用 DNAMAN 进行序列同源性分析，测序结果与优化后 DEX 基因的同源性为 100%，序列大小、方向均一致，表明目的基因已正确插入载体 PPIC9k 中，见图 1。随机挑取的 8 株重组子的菌落 PCR 电泳验证结果中有 6 株扩增出了与 DEX 基因大小一致的条带，证明 pPIC9K-DEX 已成功转入毕赤酵母。重组毕赤酵母菌株表现为 Mut⁺型，在甲醇诱导的强启动子 AOX1 的驱动下，重组蛋白由 α-factor 信号肽引导至胞外分泌，见图 2。

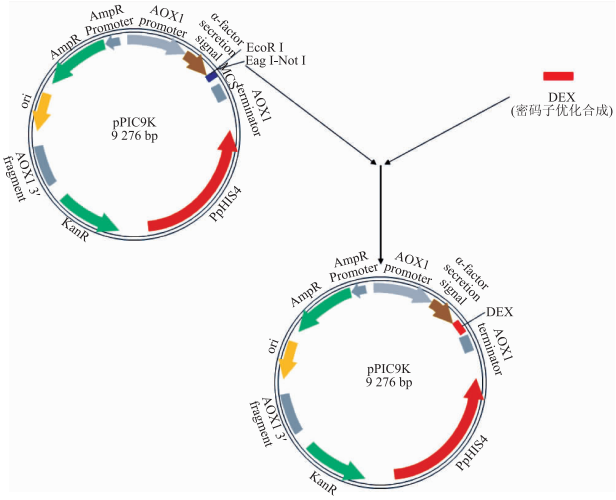
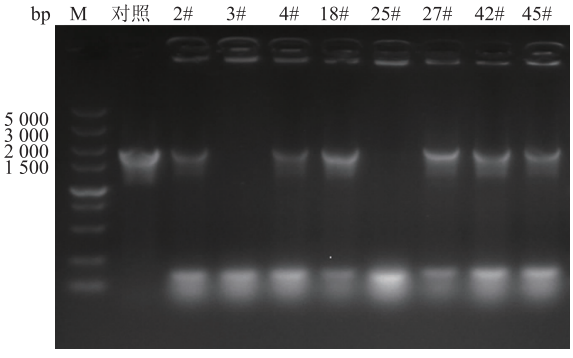


图 1 工程质粒 pPIC9k-DEX 的构建图谱

Fig. 1 Construction of the engineering plasmid pPIC9k-DEX



M：DNA Marker；对照：DEX 基因；2# - 45#：转化子

图 2 重组酵母菌的菌落 PCR

Fig. 2 Colony PCR of recombinant yeast

2.3 重组毕赤酵母菌株表达优化结果

将转化成功的重组子进行摇瓶发酵培养并测定 α-葡聚糖酶的表达量，结果发现初始摇瓶表达量最高的一株重组菌 27# 的发酵液酶活为 2.692 U/mL。

图 3 为重组菌 27# 的生长曲线图。14 h 之前为该菌株的生长延滞期，16~24 h 为对数生长期，24~28 h 为对数生长期后期，30 h 以后进入稳定期。因此，摇瓶时间优化条件选择在 18~28 h 进行。

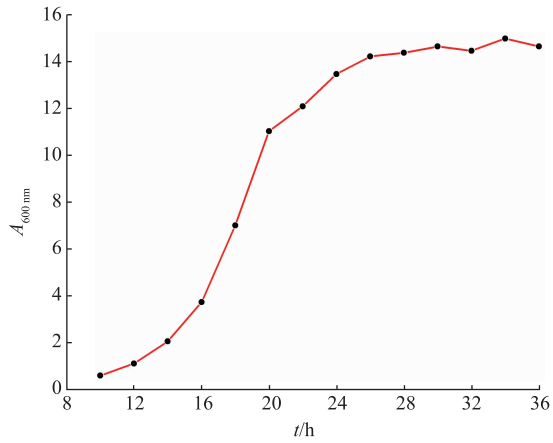


图 3 重组毕赤酵母的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of recombinant *P. pastoris*

图 4 中(a)为重组 α-葡聚糖酶基因的高拷贝筛选结果。随着 G418 质量浓度的升高该重组菌的产酶能力逐渐增强，当 G418 质量浓度为 5 mg/mL 时，该重组菌株产酶最高，为 6.158 U/ml，比初始酶活提高约 2.3 倍。但当质量浓度增加至 6 mg/mL 时，酶活骤然降低，可能是由于蛋白质的过度折叠影响了细胞的代谢水平[20]。

图 4(b)—(h)为摇瓶发酵条件优化结果。通过单因素实验条件的优化，最佳摇瓶水平发酵条件为：重组菌株生长 26 h、诱导温度 24 ℃、体积分数 2.5%的甲醇每 24 h 添加一次、转速 230 r/min、初始 pH 为 8、山梨醇添加量为 5 mg/mL 时的重组酶表达量最高达47.915 U/mL，比初始表达量提高了 17.80倍。

2.4 重组 α-葡聚糖酶的纯化结果

阴离子交换层析结果如图 5 所示，透析后的粗酶液流经 Hitrap Q HP 层析柱后，有一部分蛋白质直接随缓冲液流穿，a 峰即为流穿的蛋白质；b 部分为 100% B 液(pH 7.4，含 1 mol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl)在 NaCl 质量分数为 0~12.5%线性洗脱出的不同紫外吸收峰。收集后测定，目标蛋白质在流

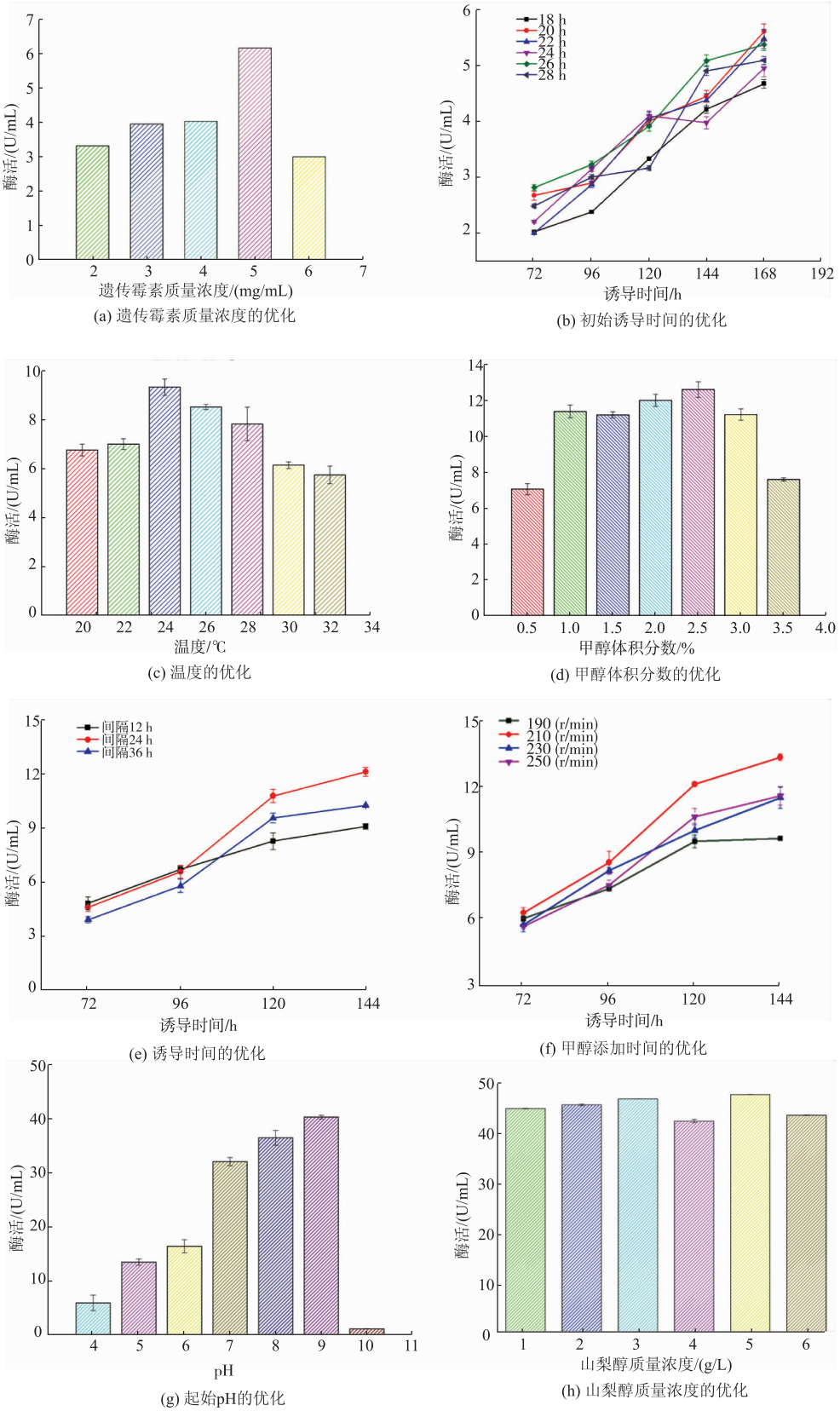


图 4　重组菌产 *α*-葡聚糖酶的优化结果

Fig. 4　Optimization of *α*-glucanase production by recombinant strains

穿样品 a 中，而洗脱峰 b 全部为杂蛋白洗脱峰。重复多次收集 a 部分样品做 SDS-PAGE 电泳验证。

阳离子交换层析结果如图 6 所示，将上一步分离得到的目标蛋白质样品透析约后上 Hitrap HP SP 层析柱，图 6(a)中，a 处为流穿样品，b 部分为不同 NaCl 质量分数梯度下洗脱出的目标蛋白质样品。经收集后测定在 b 处检测到目标蛋白质。图 6(b)为 b 的放大图，目标蛋白质在收集体积为 65~70 mL 处被洗脱。收集图 6 (b) 中的目标蛋白质样品做 SDS-PAGE 电泳验证。

SDS-PAGE 电泳结果显示粗酶液经两步离子交换层析纯化后只有一条清晰的条带，说明该重组酶已被纯化至电泳纯，且该条带大小与 α-葡聚糖酶理论值 65 4500 一致。结果见图 7。

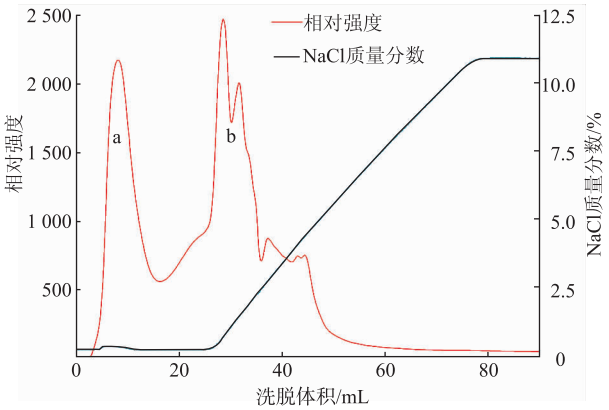


图 5　重组 α-葡聚糖酶的 Hitrap Q HP 层析图谱

Fig. 5　Hitrap Q HP chromatography of recombinant α-glucanase

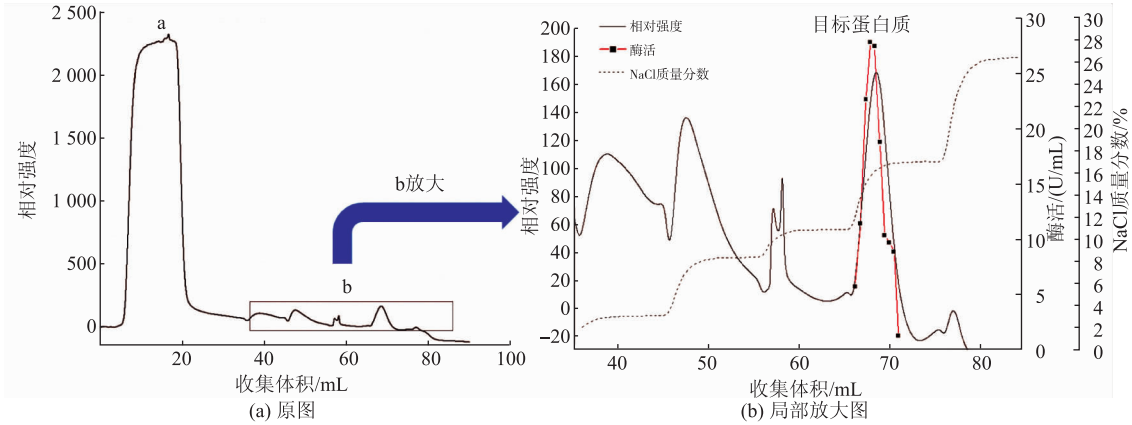
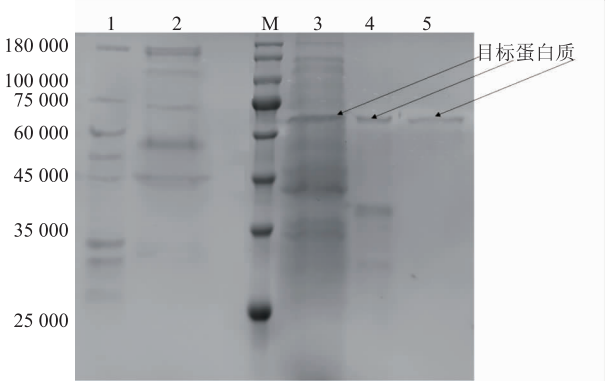


图 6　重组 α-葡聚糖酶的 Hitrap HP SP 层析图谱

Fig. 6　Hitrap HP SP chromatography of recombinant α-glucanase



M：Marker；1：空载 pPIC9k 发酵液上清；2：原始菌 GS115 发酵液上清液；3：重组菌粗酶液；4：阴离子交换层析结果；5：阳离子交换层析结果。

图 7　重组酵母菌摇瓶发酵液上清的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 7　SDS-PAGE identification of supernatant of recombinant yeast flask fermentation broth

表 2　重组 α-葡聚糖酶的分离纯化结果

Table 2　Isolation and purification of recombinant α-glucanase

纯化步骤	总酶活/U	总蛋白质质量/mg	比活/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
发酵上清液	3 245.15	477.33	6.80	0.00	100
阴离子交换层析	2 316.64	91.51	25.31	3.72	71.39
阳离子交换层析	783.62	5.65	277.61	40.83	24.15

重组 α-葡聚糖酶在粗酶液中比活为 6.80 U/mg，杂蛋白质多造成了其比活低且目标蛋白质的表达水平较低。经两步离子交换层析纯化后的重组酶的比活达 277.61 U/mg，回收率为 24.15 %，纯化倍数为 40.83。

2.5　重组 α-葡聚糖酶特性表征

如图 8 所示，重组 α-葡聚糖酶活性随温度的升

高逐渐增强,60 ℃时最高。当温度继续升高,其酶活性快速下降,说明该重组酶对高温比较敏感,温度的持续升高很大程度上影响了其催化活性。该重组酶在 20~50 ℃的水浴锅中分别保温 1 h 和 3 h 之后,剩余酶活均维持在 70%以上,保温 1 h 后的剩余酶活均略高于保温 3 h,较短时间内在不同温度下酶活略有降低但变化不大。55 ℃时的剩余酶活均骤然下降,保温3 h 后酶活均略低于保温 1 h。在温度达到 70 ℃时,两种条件下的剩余酶活均已处于很低的水平,高温已在很大程度上破坏了酶的活性。最适反应温度60 ℃与原始菌 α-葡聚糖酶[24]一致,但热稳定性略有下降。斯达油脂酵母菌来源的 α-葡聚糖酶在毕赤酵母 X33 中重组后的最适温度仅为 35 ℃[22]。

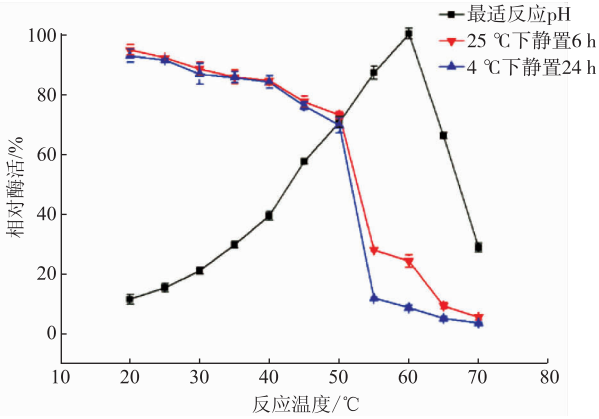


图 8 重组 α-葡聚糖酶的最适反应温度和热稳定性

Fig. 8 Optimal reaction temperature and thermal stability of recombinant α-glucanase

重组酶的最适 pH 为 5.5,在 pH 4~6 范围内,该酶酶活可达 80%以上,当 pH 小于3.5 时,该酶酶活骤然下降,见图 9。说明重组 α-葡聚糖酶对低 pH 环境非常敏感,在低 pH 环境下其催化作用迅速降低;当 pH 大于 6 时,重组 α-葡聚糖酶酶活缓慢下降,说明该重组酶对碱性环境的敏感性低于酸性环境,当 pH 大于 9.5 时,其相对酶活才降低到较低水平。在 pH 稳定性探究实验中,该重组酶在室温(25 ℃)下放置 6 h 和 4 ℃放置 24 h 酶活稳定范围较宽,在 pH 为 4.5~8.5 时,其剩余酶活均可维持在80%左右的较高水平;但是对较酸性环境和碱性环境比较敏感。与原始菌的 α-葡聚糖酶[24]相比,最适 pH 值一致,但其 pH 稳定范围略有提高,在碱性环境 pH 8.5 时仍有良好的稳定性。而油脂酵母来源的 α-葡聚糖酶基因在毕赤酵母 GS115 中表达后所产重组酶的 pH 稳定范围仅为 4~6[23]。

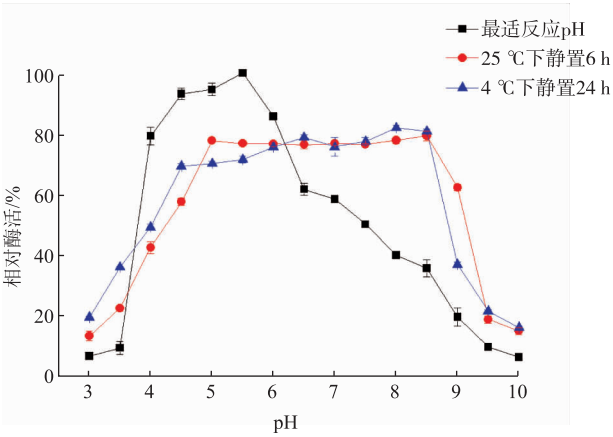


图 9 重组 α-葡聚糖酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性

Fig. 9 Optimal pH and pH stability of recombinant α-glucanase

不同种类和浓度的金属离子对该重组酶产生的影响不同,结果见表 3。其中,Mg^{2+}、Ca^{2+}、Fe^{3+}、Li^{+}、Na^{+}在低浓度(小于 10 mmol/L)时对该重组酶有轻微的抑制作用,但在较高浓度(10 mmol/L)时,Ca^{2+}和 Fe^{3+}又对其具有轻微的促进作用,使其相对酶活略有提高。Zn^{2+}、Cu^{2+}、Cr^{3+}、K^{+}均对该重组酶有不同程度的抑制作用,其中 Zn^{2+}和 Cu^{2+}对其的影响随着浓度升高逐渐增强,其中 Cu^{2+}的抑制作用最为明显,在低浓度(0.1 mmol/L)时,该重组酶的相对剩余酶活已低于50%,在浓度为 10 mmol/L 时,其相对剩余酶活已不足 10%。Cu^{2+}对该酶的抑制作用与许多研究

表 3 金属离子对重组 α-葡聚糖酶相对酶活的影响

Table 3 Effects of metal ions on recombinant α-glucanase

离子	浓度/(mmol/L)		
	0.1	1	10
Mg^{2+}	98.50±2.75	97.43±0.66	100.89±1.15
Ca^{2+}	97.91±2.49	99.08±1.52	106.16±0.62
Zn^{2+}	93.03±2.39	89.60±1.41	83.42±0.53
Mn^{2+}	100.23±1.90	100.63±1.58	98.96±0.62
Cu^{2+}	47.45±1.33	15.14±1.22	6.70±0.01
Co^{+}	101.57±2.08	102.95±2.99	98.50±0.63
Fe^{3+}	96.71±2.25	93.87±2.39	106.81±3.08
Fe^{2+}	88.64±0.72	97.82±0.81	112.87±2.72
Li^{+}	95.19±0.69	99.95±1.78	100.76±1.90
Cr^{3+}	94.98±2.51	97.10±3.31	91.89±1.00
Na^{+}	98.01±2.24	99.58±1.82	99.00±1.36
K^{+}	91.24±3.08	99.52±2.96	96.83±1.29
Control	100	100	100

报道一致[7,9,12]。而 Cr^{3+}、K^{+}则是在低浓度(0.1 mmol/L)和较高浓度(10 mmol/L)时对其有抑制作用。Fe^{2+}在 1 mmol/L 以下浓度时对该重组酶有抑制作用，但在较高浓度(10 mmol/L)时对其激活促进作用明显增加。还有一些离子如 Na^{+}、Co^{+}、Mn^{2+}等对该重组酶的抑制和促进作用均不太明显。

根据该重组 α-葡聚糖酶催化不同底物时的反应速率，采用线性拟合法计算出该重组酶催化不同相对分子质量底物（底物分别为葡聚糖 T20、T40、T70 和 T2000)时的动力学参数，结果如图 10 所示。由图 10 可计算得出该重组酶对葡聚糖 T20、T40、T70 和 T2000 的 K_m 值分别为：2.25×10^{-3}、1.32×10^{-3}、1.89×10^{-4}、7.4×10^{-6} mol/L，V_m 分别为：1.20×10^{-2}、5.83×10^{-3}、7.33×10^{-3}、2.72×10^{-5} mol/(L·min)。K_{cat}=3.81×10^{2} s^{-1}。结果表明该重组酶对高相对分子质量的葡聚糖底物更具亲和力，葡聚糖 T2000 为最适底物。与原始菌 α-葡聚糖酶一致[24]，与王乐怡等[10]研究的重组 α-葡聚糖酶最适底物一致。

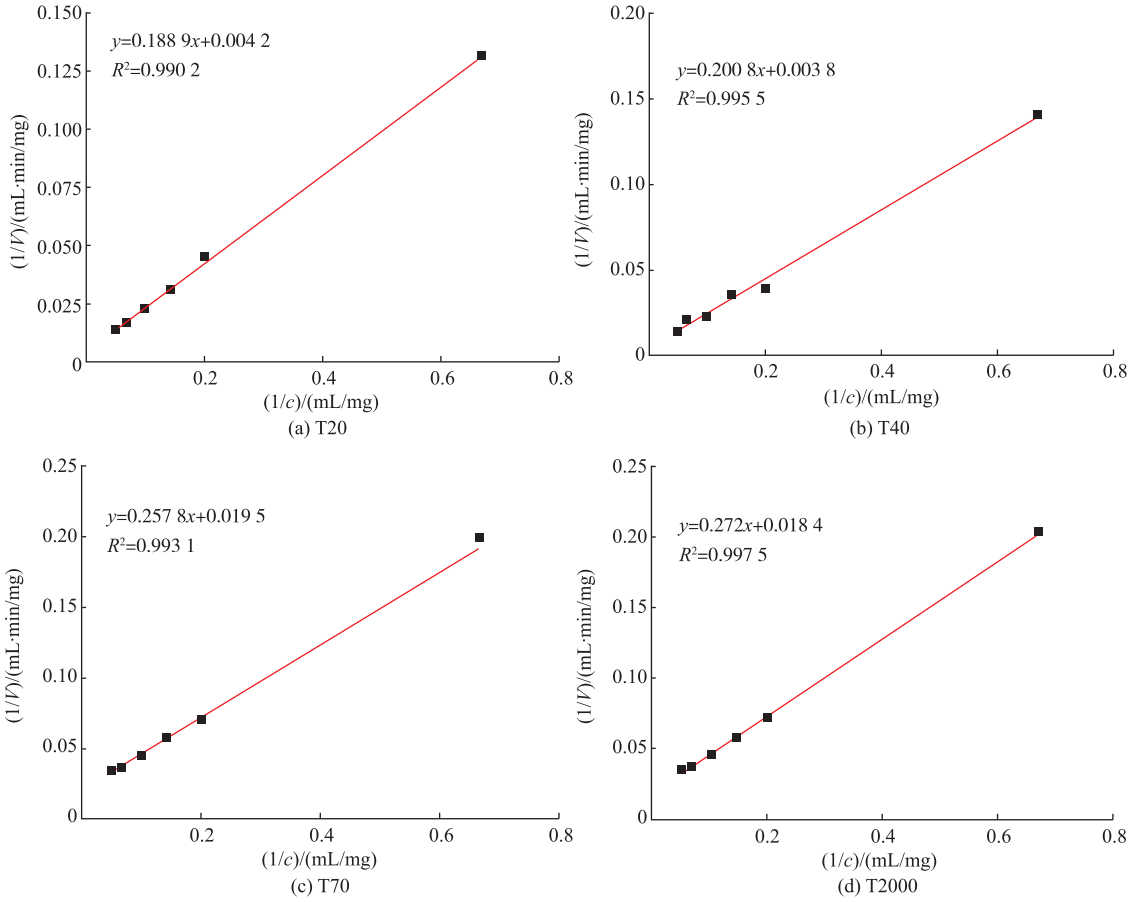


图 10　重组 α-葡聚糖酶对不同底物的动力学参数

Fig. 10　Kinetic parameters of recombinant α-glucanase on different substrates

3 结　语

在前人研究基础上，将球毛壳菌(*C.globosum*)来源的 α-葡聚糖酶基因序列根据巴斯德毕赤酵母密码子偏好性进行了优化合成，并成功构建了重组毕赤酵母菌株，经过高拷贝筛选及摇瓶水平的条件优化，将酶活提高了 17.80 倍。采用阴离子交换和阳离子交换双步层析相结合的纯化手段[25]，成功将粗酶液纯化至电泳纯水平。对该重组酶的酶学性质探究发现，重组 α-葡聚糖酶与野生菌产 α-葡聚糖酶相比，最适温度和 pH 均一致，且 pH 稳定性范围有所提高，猜测可能是由于在真核细胞中发生了某种修饰，这种修饰作用使得该重组酶对碱性环境的耐受力更强。在探究酶动力学实验中发现该酶的最适底物同野生菌[11]的 α-葡聚糖酶相同，且 K_m 值(7.4×10^{-6} mol/L）低于原始菌 α-葡聚糖酶的 K_m 值(3.1×10^{-2} mol/L)，说明重组后的 α-葡聚糖酶对底物 T2000 的亲和性更高。

参考文献:

[1] 张宇琪,张洪斌,甘微苇,等. 右旋糖酐酶研究进展[J]. 生物工程学报,2015,31(5):634-647.
[2] 王健,王宝,陈海军,等. α- 葡聚糖酶在制糖工业中的应用[J]. 中国酿造,2018,37(10):9-13.
[3] 陈帅,刘炜熹,刘磊,等. 酶制剂在蔗汁澄清工艺中的研究进展[J]. 中国调味品,2019,44(12):172-175.
[4] 张菡,吴子毅,赵抒娜,等. α- 葡聚糖酶在甜菜制糖中的试验研究[J]. 中国糖料,2019,41(1):13-18.
[5] 唐小康,包星海,栾立标. 葡聚糖微球的制备及应用进展[J]. 精细化工中间体,2017,47(1):1-4.
[6] 陈淑芬.右旋糖酐铁联合维生素 C 治疗儿童缺铁性贫血的临床疗效及对铁代谢的影响[J].黑龙江医药,2020,33(2):346-348.
[7] DENG T,FENG Y l,XU L X,et al. Expression,purification and characterization of a cold-adapted dextranase from marine bacteria and its ability to remove dental plaque[J]. **Protein Expression and Purification**,2020,174:1-8.
[8] 青木優子,郑苏江,野村安雄,等. 含葡聚糖酶牙膏对牙菌斑模型的分解和去除研究[J]. 口腔护理用品工业,2018,28(3):12-14.
[9] 王雅洁,芮广虎. 右旋糖酐酶产生菌的筛选、鉴定及发酵[J]. 长江大学学报(自然科学版),2014,11(5):45-49.
[10] 王乐怡. 食品级 α- 葡聚糖酶的表达平台构建及其酶学性质解析[D]. 南宁:广西大学,2019.
[11] 杨柳. 球毛壳(*Chaetomium globosum*)产 α- 葡聚糖苷酶的诱变,优化及酶学特性[D]. 无锡:江南大学,2019.
[12] WAKIL S M,JBIKUNLE O J,AKINYELE H A. Production and characterization of dextranase by *Penicillium brevicompactum* isolated from garden soil[J]. **Journal of Advances in Microbiology**,2018,13(4):1-12
[13] 王赟,章晓庆,王风清. 朱黄青霉 α-1,6- 葡聚糖酶在毕赤酵母 GS115 中的异源表达[J]. 食品与药品,2014,16(2):77-80.
[14] LIANG D F,WU Z P,ZENG L Q,et al. Study on the method of methanol induction in dextranase fermentation by recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Sugarcane and Canesugar**,2011(10):5.
[15] 胡玮,张慧玲,魏欢,等. 源于 *Paecilomyces* sp. FLH30 内切 β-1,3(4)葡聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达[J]. 新疆农业科学,2016,53(9):1715-1725.
[16] YANG H Y,TIAN Y P,ZHOU N,et al. Optimized expression of prolyl aminopeptidase in *Pichia pastoris* and its characteristics after glycosylation[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2016,32(11):176.
[17] LIU J D,SUN Q J,YIN H,et al. Optimal fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* expressing a dextranase from *Chaetomium gracile*[J]. **Sugar Technology**,2020,22(1):171-178.
[18] HUANG Z W,WU Z P,CHANG G W,et al. Scale-up fermentation of recombinant dextranase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Sugarcane and Canesugar**,2016(1):20-26.
[19] ZHANG Y Q,LI R L,ZHANG H B,et al. Purification,characterization,and application of a thermostable dextranase from *Talaromyces pinophilus*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2017,44:317-327.
[20] 席宏星. 重组毕赤酵母高效表达细菌亮氨酸氨肽酶及发酵优化[D]. 无锡:江南大学,2015.
[21] 问清江,慕娟,孙晓宇,等. 右旋糖酐酶酶学性质研究[J]. 陕西农业科学,2019,65(5):50-53.
[22] 望魁甲,王笃强,廖远平,等. 重组右旋糖酐酶的表达、纯化及性质研究[J]. 生物化工,2018,4(2):30-35.
[23] 吴兆鹏,蚁细苗,曾练强,等. α- 葡聚糖酶的酶学性质初步研究[J]. 甘蔗糖业,2012(3):47-52.
[24] YANG L,ZHOU N D,TIAN Y P. Characterization and application of dextranase produced by *Chaetomium globosum* mutant through combined application of atmospheric and room temperature plasma and ethyl methyl sulfone[J]. **Process Biochemistry**,2019,85:116-124.
[25] 田亚平. 生化分离原理与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2020.
[26] 杨帆. 右旋糖酐酶高产菌株选育及其酶学性质研究[D]. 芜湖:安徽工程大学,2017.
[27] 黎志德,梁达奉,张九花,等. 毛壳菌来源的 α- 葡聚糖酶酶学性质分析及制糖生产辅料对其活性影响[J]. 甘蔗糖业,2019(2):37-43.
[28] 吴敏,张宇馨,胡雪芹,等. 棘孢青霉右旋糖酐酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品科学,2018,39(18):73-80.
[29] 张宇琪. 右旋糖酐酶产生菌的筛选、酶学性质及其应用研究[D]. 合肥:合肥工业大学,2016.