

# 基于体外分子进化技术提高弯曲芽孢杆菌 CCTCC 2015368 $\beta$ -淀粉酶的热稳定性

陈磊<sup>1,2</sup>, 陈晟<sup>1,2</sup>, 吴敬<sup>1,2</sup>, 吴丹<sup>1,2</sup>

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

陈磊, 陈晟, 吴敬, 等. 基于体外分子进化技术提高弯曲芽孢杆菌 CCTCC 2015368  $\beta$ -淀粉酶的热稳定性. 生物工程学报, 2018, 34(2): 255–263.

Chen L, Chen S, Wu J, et al. Enhancing thermostability of  $\beta$ -amylase from *Bacillus flexus* CCTCC 2015368 based on *in vitro* molecular evolution. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 255–263.

**摘 要:** 运用体外分子进化技术易错 PCR 方法, 高通量筛选热稳定性提高的弯曲芽孢杆菌 *Bacillus flexus* CCTCC 2015368  $\beta$ -淀粉酶突变体。利用 LB 琼脂淀粉板显色、96-孔板 DNS 法测酶活和酶标仪检测等, 最终筛选到了一株热稳定性显著提高的突变体 D476N。野生型和突变体 D476N 分别纯化后, 酶学性质测定表明: 突变体 D476N 的最适 pH 为 6.5, 与野生型相比降低了 0.5。突变体 D476N 和野生型的最适温度均为 55 °C, 突变体 D476N 在 55 °C 下的半衰期为 35 min, 比野生型提高了 95%。突变体 D476N 的  $T_{50}$  值比野生型提高 4 °C。突变体 D476N 的  $K_m$  值为 97.98  $\mu\text{mol/L}$ , 是野生型 (85.86  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.14 倍; 突变体稳定性提高的同时, 催化活力相对于野生型有略微下降。通过 SWISS-MODEL 同源模拟野生型和突变体 D476N 的三维结构, 并通过 PyMol 软件分析, 发现突变后的氨基酸残基 Asn476 位于蛋白质表面的 loop 环上, 通过 MOE 软件计算, D476N 的分子自由能 ( $\Delta G$ ) 为 106.01 kcal/mol, 比野生酶降低 10.3%, 这一结果与蛋白质分子自由能和热稳定性呈负相关的理论相符。

**关键词:** 分子进化, 易错 PCR,  $\beta$ -淀粉酶, 热稳定性

**Received:** May 26, 2017; **Accepted:** August 8, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31571776), National Outstanding Youth Fund (No. 31425020), Jiangsu University Outstanding Scientific and Technological Innovation Team Project, 111 Plan (No. 111-2-06), Central University Basic Scientific Research Business Special Funds (No. JUSRP51706A).

**Corresponding author:** Dan Wu. Tel/Fax: +86-510-85326653; E-mail: wudan@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31571776), 国家杰出青年基金 (No. 31425020), 江苏高校优秀科技创新团队项目, 111 计划 (No. 111-2-06), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP51706A) 资助。

# Enhancing thermostability of $\beta$ -amylase from *Bacillus flexus* CCTCC 2015368 based on *in vitro* molecular evolution

Lei Chen<sup>1,2</sup>, Sheng Chen<sup>1,2</sup>, Jing Wu<sup>1,2</sup>, and Dan Wu<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** We used *in vitro* molecular evolution technology by error-prone PCR and high-throughput screening to improve thermostability of *Bacillus flexus* CCTCC 2015368  $\beta$ -amylase. Mutant D476N with significant thermostability increase was selected by LB agar starch plate colorimetric assay and 96-well plate enzyme activity assay. The optimum pH was 6.5 for the mutant D476N, compared to 7.0 of the wild type. The optimal temperature was 55 °C for both mutant D476N and the wild type. The  $T_{50}$  value of the mutant D476N was 4 °C higher than that of the wild type. The half-life of mutant D476N at 55 °C was 35 min, 95% higher than that of the wild type. The  $K_m$  of the mutant D476N was 97.98  $\mu\text{mol/L}$ , 1.14 times of that of the wild type (85.86  $\mu\text{mol/L}$ ). The thermostability of the mutant D476N was slightly lower than that of the wild type. The three-dimensional structure of wild type and mutant D476N was simulated by SWISS-MODEL and analyzed by PyMol software. The mutated amino acid residue Asn476 was located on the loop of protein surface. The molecular free energy ( $\Delta G$ ) of D476N was calculated by MOE software was 106.0 kcal/mol, reduced by 10.3% compared to the wild enzyme. These results were consistent with the theory that the protein molecular free energy and thermostability were negatively correlated.

**Keywords:** molecular evolution, error-prone PCR,  $\beta$ -amylase, thermostability

$\beta$ -淀粉酶 ( $\beta$ -amylase, EC 3.2.1.2), 又称淀粉  $\beta$ -1,4-麦芽糖苷酶, 是一种外切型淀粉酶, 能够从淀粉的非还原末端依次水解相隔的  $\alpha$ -1,4-葡萄糖苷键生成麦芽糖。在大麦、甘薯、玉米、小麦和大豆等高等植物中都有着较丰富的  $\beta$ -淀粉酶, 其在酿造行业及食品工业中有很大的应用价值。例如, 啤酒酿造行业利用麦芽中的  $\beta$ -淀粉酶直接糖化, 白酒工业中用作糖化剂; 在食品工业中主要用于生产高麦芽糖浆、麦芽糖醇和饴糖等。自 1974 年 Higashihara 等<sup>[1]</sup>首次发现了巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 胞外含有  $\beta$ -淀粉酶以来, 又陆续发现其他几种能产生该酶的微生物, 包括蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*<sup>[2-3]</sup>、环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans*<sup>[4]</sup>、多粘芽孢杆菌 *Bacillus polymyxa*<sup>[5]</sup>、热厌氧杆菌属 *Thermoanaerobacterium* 和高温放线菌 *Thermoeactinomyces* sp.<sup>[6]</sup>等。

由于植物来源的  $\beta$ -淀粉酶提取、纯化过程较为复杂, 成本较贵, 相比而言微生物来源的  $\beta$ -淀粉

酶具有生产操作简单、适合大规模工业化生产的优点。但是现已报道的微生物来源的  $\beta$ -淀粉酶大多耐热性差, 且比酶活不高, 不利于其工业化应用。因此筛选出高热稳定性的微生物  $\beta$ -淀粉酶对其在淀粉糖工业中的应用有着十分重要的意义。

易错 PCR 属于蛋白质的非理性设计, 不需要事先了解蛋白质的结构、催化机制、保守序列等因素, 而是通过模拟自然进化机制来为酶基因创造体外进化的条件, 进而对目的蛋白进行分子改造, 并定向筛选研究进化酶的酶学性质。易错 PCR 技术是目前应用最广泛的定向进化方法之一, 具有操作方便、快速、高效的优点。

目前国内外多数专家学者使用体外分子进化技术研究了多种酶制剂<sup>[7]</sup>, 诸如脂肪酶、木聚糖酶、 $\beta$ -葡聚糖酶等, 其酶学性质都得到了一定的改善。对于微生物来源  $\beta$ -淀粉酶的研究, 目前主要是围绕不同宿主的克隆表达、酶学定性<sup>[8]</sup>, 而针对其酶学性质的分子改造显得较少, 在定向进化提

高其热稳定性方面, 尚未见相关文献报道。 $\beta$ -淀粉酶作为一种重要的工业用酶, 广泛应用于淀粉糖、食品及医药等生产领域。例如, 与麦芽糖淀粉酶、普鲁兰酶等复配制备超高纯度麦芽糖浆, 生产高附加值的海藻糖、麦芽酮糖等。然而其热稳定性差, 不利于酶的复配转化, 具有容易染菌、反应液粘度高等缺点。本研究通过易错 PCR 技术对比酶活较高的弯曲芽孢杆菌来源的  $\beta$ -淀粉酶进行体外分子定向进化, 通过 LB 琼脂淀粉板初筛、96 孔板 DNS 法测酶活等方法, 高通量筛选热稳定性提高的突变体, 以期为其工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

*Escherichia coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保存; 载体 pET-24a(+) 和 pMD18-T 购于大连宝生物公司。野生型  $\beta$ -淀粉酶基因来源 *Bacillus flexus* CCTCC 2015368 (*bfa*), 现已保存在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC)。

#### 1.1.2 培养基

LB 液体培养基: 酵母粉 5.0 g/L, 胰蛋白胨 10.0 g/L, NaCl 10.0 g/L。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基的基础配方上, 添加 1.0%–2.0% (W/V) 的琼脂。

TB 培养基: 酵母粉 24.0 g/L, 甘油 5.0 g/L, 胰蛋白胨 12.0 g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  16.43 g/L,  $KH_2PO_4$  2.31 g/L。

SOB 培养基: 胰蛋白胨 20.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L,  $MgCl_2$  0.952 g/L, NaCl 0.5 g/L, KCl 0.186 g/L。

LB 琼脂淀粉板: 在 LB 液体培养基的基础上添加可溶性淀粉 1 g/L, 用于突变体的初步筛选。

#### 1.1.3 试剂

rTaq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Primer Star<sup>TM</sup> HS DNA 聚合酶、DL-2000 和

DL-10000 DNA Marker 均购于 TaKaRa 有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒和质粒小提试剂盒均购自天根生化科技有限公司; 中分子量标准蛋白、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 试剂盒均购于碧云天生物技术有限公司 (上海); 卡那霉素 (Kan)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 均购自上海生工生物工程有限公司; 分子级的胰蛋白胨和酵母粉购自英国 Oxoid 公司; 所有质粒测序均由上海睿迪生物技术有限公司提供支持; 无特殊说明, 其他试剂均属于国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 突变体文库的构建和易错 PCR 技术

来源于 *Bacillus flexus* CCTCC 2015368 (*bfa*) 的  $\beta$ -淀粉酶基因用作构建突变体文库的模板, 并设计上游引物 (5'-AACCATGGCGGTAAATGGACAGTCGTT-3') 和下游引物 (5'-AACTCGAGTTACCAATTATT、CGTATACGTTG-3'), 并分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点 (下划线部分)。最适反应缓冲体系 (50  $\mu$ L) 为: 2 mmol/L  $MgCl_2$ , 0.1 mmol/L  $MnCl_2$ , 0.2 mmol/L dNTPs, DNA 模板为 50 ng, 5  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液  $Mg^{2+}$ (-) 和 rTaq DNA 聚合酶为 5 U, 再加入 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}C$  4 min; 98  $^{\circ}C$  10 s, 53  $^{\circ}C$  10 s, 72  $^{\circ}C$  1 min 40 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}C$  延伸 10 min, 并于 4  $^{\circ}C$  下保温。

将 PCR 产物用 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳验证, 用 PCR 纯化试剂盒进行胶回收。纯化后的 *bfa* 基因和载体 pMD-18T 连接转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。用 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性内切酶消化质粒 *bfa*-pMD-18T, 获得易错 *bfa* 基因, 然后连接到载体 pET24a(+), 得到的质粒命名为 pET-*bfa*。重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达宿主中, 涂布于 LB 抗性平板 (Kan 30  $\mu$ g/mL), 构建突变体文库。

#### 1.2.2 突变体文库的筛选

使用高通量筛选平台 (Molecular Devices,

Qpix 2) 从 LB 抗性平板 (Kan) 上挑选易错突变体 BFA, 将单克隆——对应地接种到含有 600  $\mu\text{L}$  新鲜 LB 培养基 (Kan, 30  $\mu\text{g/mL}$ ) 的 96 深孔板中。重组菌在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、900 r/min 下恒温振荡摇床中培养 8–10 h, 相同条件下转接 50  $\mu\text{L}$  种子培养基到含有 600  $\mu\text{L}$  新鲜 TB 培养基的 96 孔板中培养 2 h, 然后加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG 诱导表达重组酶<sup>[9]</sup>。重组菌在 25  $^{\circ}\text{C}$  下诱导表达 48 h 后, 将发酵液在 4 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 20 min, 取上清 200  $\mu\text{L}$  于 96 浅孔板中, 这些 96 浅孔板中的酶液将用于初筛的酶活分析。本研究设计了一个 LB 琼脂淀粉板用于突变体 BFA 的初筛分析, 通过使用高通量筛选系统的 gridding 程序, 将突变体 BFA 的发酵上清——转接到琼脂淀粉板并于 37  $^{\circ}\text{C}$  下过夜培养。随后用碘液 0.03% (W/V) 涂布琼脂淀粉板, 发现有  $\beta$ -淀粉酶活力的地方会产生透明圈, 初筛的标准是根据透明圈的大小来判断的。选择突变体 BFA 酶活高于或等于野生型的, 然后接种于 96 深孔板进一步筛选。最后通过 96-孔板 DNS 法定量测定突变体 BFA 的酶活, 选择出酶活大于或者等于野生型的突变体用于复筛分析。

### 1.2.3 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶的诱导表达和分离纯化

将带有重组质粒 pET-*bfa* 的大肠杆菌在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下摇瓶培养 LB 种子 (Kan, 30  $\mu\text{g/mL}$ ) 8–10 h, 然后吸取种子培养基 2.5 mL 接种到 50 mL 的 TB 发酵培养基中。在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下摇瓶培养 2 h 后加入终浓度为 0.05 mmol/L 的 IPTG, 最后转移摇瓶至 25  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续培养 48 h<sup>[10]</sup>。发酵液于 8 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  下离心 20 min 收集上清液。向上清液中加入研磨之后的硫酸铵至终浓度为 45% (W/V), 混合物于 4  $^{\circ}\text{C}$  下过夜培养并用磁力搅拌器不断搅拌, 确保沉淀完全。然后将混合物在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀, 并用 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸

氢二钠缓冲液 (pH 6.5) 悬浮, 过夜透析。样品加载到用 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液平衡的 Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL 凝胶柱上, 在 0.5 mL/min 的流速下使用上述缓冲液进行洗脱、收集纯化样品。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, 12% 聚丙烯酰胺) 检测目的蛋白的纯度和分子量<sup>[11]</sup>。

### 1.2.4 酶活力的测定

$\beta$ -淀粉酶活力分析是通过测定水解淀粉所释放的还原糖的量。反应体系的混合物包括: 0.5 mL 2% (W/V) 的可溶性淀粉, 0.4 mL 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 7.0), 并将酶液稀释成适宜的浓度添加至最后体积为 1 mL。在 55  $^{\circ}\text{C}$  下反应 10 min 之后, 向 1 mL 的混合体系加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 终止反应。混合物在沸水中煮沸 5 min 发生显色后立即于冰浴上冷却, 然后补加去离子水至最后体积为 12 mL, 最后在 540 nm 下检测上述溶液的吸光值; 并以相同条件下缓冲液的测定作为空白对照。

上述条件下, 每分钟生成 1  $\mu\text{mol/L}$  麦芽糖所需要的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

### 1.2.5 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶的动力学参数

在 55  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.0 的条件下以不同浓度的可溶性淀粉作为底物 (1–30 mg/mL), 通过上述 DNS 法测定纯化后的野生型和突变体酶的动力学参数。使用 GraphPad Prism 6.0 软件将获得的数据拟合到 Michaelis-Menten 方程, 得出  $K_m$  和  $k_{cat}$  值。计算野生型和突变体的  $k_{cat}/K_m$ , 并比较结果。

### 1.2.6 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶最适温度及热稳定性的分析

纯化后的酶液分别在不同的温度范围内 (30–70  $^{\circ}\text{C}$ ) 测定  $\beta$ -淀粉酶活力, 以最高的酶活力为 100%, 从而确定出野生型和突变体  $\beta$ -淀粉酶的最适温度。

在 55  $^{\circ}\text{C}$  下将纯化后的  $\beta$ -淀粉酶保温在柠檬

酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH 7.0) 中, 于不同的时间范围内 (10–70 min) 分别取出样品并冰浴 10 min, 同时在不同温度下保温 10 min, 测定酶活力丧失 50% 时的温度, 即酶的半失活温度  $T_{50}$ 。按照上述的 DNS 法测定残留酶活, 并以未处理的酶活为 100%, 用作测定野生型和突变体  $\beta$ -淀粉酶的半衰期。

### 1.2.7 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶的最适 pH 分析

在 pH 4.0–9.0 的柠檬酸缓冲液中分别将两种酶稀释一定倍数, 以上述分析的最适温度为条件测定  $\beta$ -淀粉酶酶活力, 以最高的酶活力为 100%, 从而确定出野生型和突变体  $\beta$ -淀粉酶的最适 pH。

### 1.2.8 野生型和突变体的三维结构分析

使用 SWISS-MODEL 数据 (<http://www.expasy.org/swissmod/>) 生成野生型和突变体 BFA 的三维结构模型, 并且以同源性最高的蜡状芽孢杆菌  $\beta$ -淀粉酶 (1j10.1.A PDB) 为模板<sup>[12-13]</sup>。借助 PyMol (<http://www.pymol.org>) 软件分析所有的蛋白质结构模型和图形特征。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体文库的筛选

重组菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*bfa* 在大肠杆菌中表达、发酵, 对野生型  $\beta$ -淀粉酶进行初始酶学性质研究。然后, 以重组质粒为模板, 通过设计引物进行易错 PCR 方法的高通量筛选, 表达宿主为操作简单、方便的大肠杆菌。大约有 6 000 个转化子的突变体文库被用来筛选热稳定性提高的突变体  $\beta$ -淀粉酶, 阳性突变率估算为 60%。 $\beta$ -淀粉酶水解活力的大小可以用透明圈定性分析, 采用琼脂淀粉板显色初筛得到一部分透明圈比对照大的突变体<sup>[14]</sup>。

进一步将这些突变体于 55 °C 保温 40 min, 并在 96-孔板和具塞试管中分别测定残留酶活。通过大量的实验结果和数据分析得出, 初筛有时候获得透明圈比较大的突变体, 经过复筛测酶活发现并不是很高甚至和对照差不多; 但是, 复筛得出

热稳定性显著提高的突变体, 后续摇瓶验证也会相应提高。经过一系列的初步研究验证, 与野生型  $\beta$ -淀粉酶相比, 有一株突变体的热稳定性显著提高。接下来把该突变体的质粒抽提出来送测序, 测序结果分析出突变体 BFA 只发生了一个氨基酸的替换, 将 476 位天冬氨酸突变成了天冬酰胺 (Asp476Asn)<sup>[15]</sup>。

### 2.2 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶的诱导表达和分离纯化

重组  $\beta$ -淀粉酶用 0.05 mmol/L IPTG 诱导表达于宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中, 摇瓶发酵 48 h 之后收集酶液。为了进一步研究野生型和热稳定性提高突变体  $\beta$ -淀粉酶的酶学性质, 首先对重组酶进行  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀, 透析脱盐初步纯化酶蛋白, 然后通过柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (20 mmol/L, pH 6.5) 平衡的 Superdex™ 200 10/300 GL 凝胶柱浓缩、纯化 (表 1 和图 1), 并使用 Bradford 法以牛血清蛋白为标准测定蛋白浓度<sup>[16]</sup>。从表 2 可知, 突变体 D476N 的比活力为 2 512 U/mg, 比野生酶降低了 18.76%。

### 2.3 野生型和突变体 D476N 的酶学性质分析

#### 2.3.1 野生型和突变体 $\beta$ -淀粉酶的动力学参数

在 55 °C 下, 使用不同浓度的可溶性淀粉为底物 (1–30 mg/mL), 分别测定野生型和突变体 D476N 的动力学参数 (表 2)。突变体 D476N 的  $K_m$  值为 97.98  $\mu\text{mol/L}$ , 是野生型的 1.14 倍。突变体 D476N 的  $k_{\text{cat}}$  值为 2 273.12  $\text{s}^{-1}$ , 比野生型下降了 18.97%; 突变体  $k_{\text{cat}}/K_m$  值减少为野生型的 71.01%。

#### 2.3.2 最适温度及温度稳定性

突变体 D476N 和野生型  $\beta$ -淀粉酶的最适温度和热稳定性见图 2 和图 3。

从图 2 可以得知, 野生型和突变体 D476N  $\beta$ -淀粉酶的最适温度均为 55 °C; 在 30–55 °C 的温度范围内,  $\beta$ -淀粉酶的相对活力没有明显变化; 值得注意的是, 当温度升高到 60 °C 和 65 °C 时, 突变体 D476N 能够保留最初酶活的 75% 和 44%, 而野生型仅保留其酶活的 37% 和 23%。

表 1 重组野生型和突变体  $\beta$ -淀粉酶的纯化过程参数Table 1 Parameters of purification step of the recombinant wild type and mutant  $\beta$ -amylase

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purified fold	Recovery rate (%)
<b>Wild type</b>					
Crude enzyme	367	103 925	283	1.00	100.00
Salt precipitation	208	78 624	378	1.34	76.00
Superdex™ 200 10/300 GL	1.69	5 225	3 092	10.93	5.03
<b>D476N</b>					
Crude enzyme	280	61 314	219	1.00	100.00
Salt precipitation	137	53 235	389	1.78	87.00
Superdex™ 200 10/300 GL	1.26	3 165	2 512	11.47	5.16

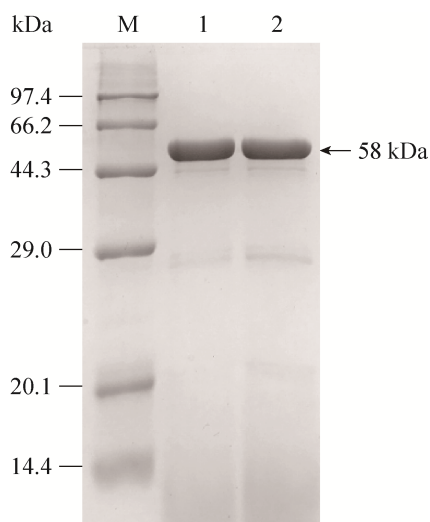
图 1 SDS-PAGE 分析纯化后的野生型和突变体 D476N  $\beta$ -淀粉酶(M: 中分子量标准蛋白; 1: 野生型; 2: 突变体 D476N)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified wild type and mutant D476N  $\beta$ -amylases. M: marker; 1: wild type; 2: mutant D476N.

表 2 野生酶和热稳定性提高突变体 D476N 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of wild type and mutant D476N enzymes

Enzyme	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_{\text{m}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ( $\text{L}/(\mu\text{mol}\cdot\text{s})$ )
Wild type	$2\,805.20 \pm 81.26$	$85.86 \pm 13.13$	$32.67 \pm 6.19$
D476N	$2\,273.12 \pm 69.52$	$97.98 \pm 15.15$	$23.20 \pm 4.59$

Enzyme reactions were measured at 55 °C, pH 7.0, using different concentrations of soluble starch as the substrate.

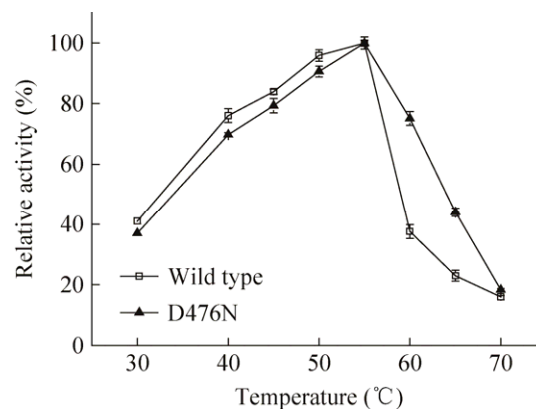


图 2 野生型和突变体 D476N 的最适温度

Fig. 2 The optimum temperature of wild type and mutant D476N.

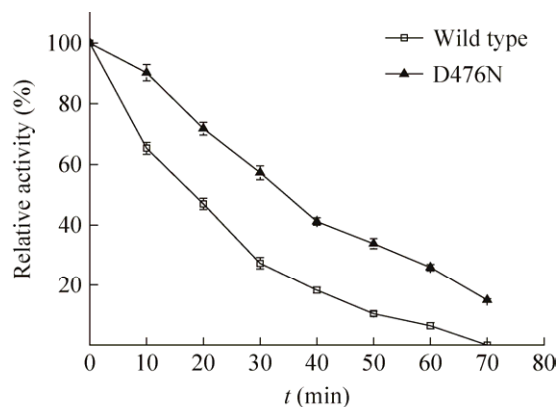


图 3 野生型和突变体 D476N 的热稳定性

Fig. 3 The temperature stability of wild type and mutant D476N.

不同温度下保温 10 min, 测定酶活力丧失 50% 时的温度, 即酶的半失活温度  $T_{50}$ 。实验结果表明, 突变体 D476N 的半失活温度  $T_{50}$  值为 62 °C, 与野生型  $T_{50}$  值 58 °C 相比提高了 4 °C。在最适温度 55 °C 的条件下, 通过测定不同时间点残留酶活来确定突变体 D476N 的热稳定性<sup>[17-18]</sup>, 并与野生型相比较 (图 3)。从图 3 可知, 突变体 D476N 在 55 °C 下的半衰期为 35 min, 而野生型的半衰期只有 18 min。

### 2.3.3 最适 pH

突变体 D476N 和野生型  $\beta$ -淀粉酶的最适 pH 见图 4。

由图 4 可见, 野生型的最适 pH 为 7.0, 突变体 D476N 的最适 pH 为 6.5; 在 pH 5.5–8.0 的范围内,  $\beta$ -淀粉酶的相对酶活力均能保持在 70% 以上。目前  $\beta$ -淀粉酶的工业化应用主要是和其他酸性淀粉酶进行复配使用, 突变体 D476N 的最适 pH 比野生型降低了 0.5 个单位, 提高了重组酶酸性耐受性, 更加有利于酶的催化反应<sup>[19]</sup>。

## 3 讨论

本研究基于易错 PCR 技术的定向进化策略筛选热稳定性提高的突变体 BFA, 经过一系列的初筛、复筛最终获得了一株热稳定性提高的突变体

D476N。突变体 *E. coli* BL21(DE3)/pET-D476N 表达在宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中, 经过硫酸铵沉淀、浓缩、纯化<sup>[20]</sup>突变体重组  $\beta$ -淀粉酶; 酶学性质和动力学参数测定发现, 突变体 D476N 与野生型相比对底物的亲和性无明显变化, 而对可溶性淀粉的催化活性有少许降低。突变体 D476N 在高温条件下能够保留较高的酶活, 表明突变体 D476N 的耐热性比野生型有明显提高<sup>[21-22]</sup>。

为了阐明突变体 D476N 热稳定性提高的机理, 对野生型和突变体 D476N 使用 SWISSMODEL 程序同源建模。以同源性最高的蜡状芽孢杆菌晶体结构为模板 (1j10.1A, PDB) 模拟得到野生型和突变体 D476N 的三维结构。最近有研究发现, 蛋白质表面的 loop 区域对蛋白质的稳定性有重要作用, 如淀粉液化芽孢杆菌来源的突变体葡聚糖酶<sup>[23]</sup>, 通过定向进化-易错 PCR 筛选得到热稳定性显著提高的突变株, 其共发生了 7 个氨基酸的取代, 有 5 个位于蛋白质的 loop 区域。使用 PyMol 软件显示出生成的突变体 D476N 的结构模型和突变点的位置, 发现突变后的氨基酸残基 Asn476 也位于蛋白质的表面 loop 上 (图 5)。

MOE 是一款基于分子动力学模拟和蛋白设计的

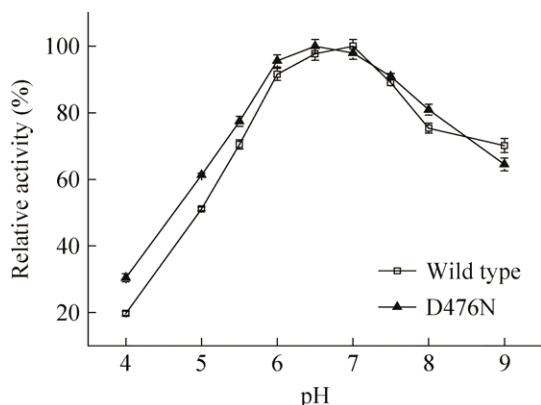


图 4 野生型和突变体 D476N 的最适 pH

Fig. 4 The optimum pH of wild type and mutant D476N.

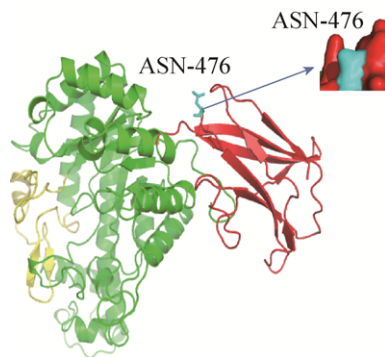


图 5 热稳定性提高的突变体 D476N  $\beta$ -淀粉酶的三维结构和突变氨基酸定位

Fig. 5 Three-dimensional structure of the mutant D476N  $\beta$ -amylase with increased thermostability and the location of mutated acid Asn476. The figure was made using PyMol.

软件,并能够计算蛋白质和小分子配体的能量,与小分子药物设计和蛋白质工程等领域紧密相关。本研究中,首先利用 MOE 软件将同源建模模拟得到的野生型和突变体 D476N 的三维 PDB 结构能量最小化,然后分别计算出野生型和突变体 D476N 的分子自由能<sup>[24]</sup>( $\Delta G$ ),软件预测结果表明野生型  $\beta$ -淀粉酶和突变体 D476N 的分子自由能分别为 118.20 kcal/mol 和 106.01 kcal/mol。根据蛋白质分子自由能( $\Delta G$ )和热稳定性呈负相关的关系,可以得知,野生型  $\beta$ -淀粉酶将 476 位的天冬氨酸替代为天冬酰胺后,导致  $\beta$ -淀粉酶的分子自由能由 118.20 降低为 106.01 kcal/mol,下降了 10.3%。这一结果为蛋白质热稳定性提高提供了有力的依据,同时也表明了蛋白质表面 loop 区域的氨基酸突变对稳定性的影响起到了显著的作用。

## REFERENCES

- [1] Rani RR, Jana SC, Nanda G. Saccharification of indigenous starches by  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium*. World J Microbiol Biotechnol, 1994, 10(6): 691–693.
- [2] Nanmori T, Shinke R, Aoki K, et al. Purification and characterization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus cereus* BQ10-S1 Spo II. Agric Biol Chem, 1983, 47(5): 941–947.
- [3] Yamaguchi T, Matsumoto Y, Shirakawa M, et al. Cloning, sequencing, and expression of a  $\beta$ -amylase gene from *Bacillus cereus* var. *mycoides* and characterization of its products. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60(8): 1255–1259.
- [4] Siggins KW. Molecular cloning and characterization of the beta-amylase gene from *Bacillus circulans*. Mol Microbiol, 1987, 1(3): 86–91.
- [5] Murao S, Ohyama K, Arai M.  $\beta$ -amylases from *Bacillus polymyxa* No. 72. Agric Biol Chem, 1979, 43(4): 719–726.
- [6] Kitamoto N, Yamagata H, Kato T, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding thermophilic  $\beta$ -amylase of *Clostridium thermosulfurogenes*. J Bacteriol, 1988, 170(12): 5848–5854.
- [7] Saha BC, Zeikus JG. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. Starch-Stärke, 1989, 41(2): 57–64.
- [8] Higashihara M, Okada S. Studies on  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* strain No. 32. Agric Biol Chem, 1974, 38(5): 1023–1029.
- [9] Zhou BY, Wang Z, Kong DY, et al. Selection of high  $\beta$ -amylase producing strain and its fermentation conditions. Chin J Biotech, 1994, 10(3): 258–262 (in Chinese).  
周蓓芸, 王峥, 孔德育, 等. 热稳定  $\beta$ -淀粉酶高产菌株选育及发酵条件研究. 生物工程学报, 1994, 10(3): 258–262.
- [10] Totsuka A, Fukazawa C. Expression and mutation of soybean  $\beta$ -amylase in *Escherichia coli*. Eur J Biochem, 1993, 214(3): 787–794.
- [11] Sohn CB, Lee SM, Kim MH, et al. Purification and characterization of  $\beta$ -amylase from *Bacillus polymyxa* No. 26-1. J Food Sci, 1996, 61(1): 230–234.
- [12] Nanmori T, Numata Y, Shinke R. Isolation and characterization of a *Bacillus cereus* mutant strain hyperproductive of  $\beta$ -amylase. Appl Environ Microbiol, 1987, 53(4): 768–771.
- [13] Nanmori T, Shinke R, Aoki K, et al.  $\beta$ -amylase production by a rifampin-resistant, asporogenous mutant from *Bacillus cereus* BQ10-S1. Agric Biol Chem, 1983, 47(3): 609–611.
- [14] Wu J, Zhang SZ. Cloning, expression and the characterization of  $\beta$ -amylase from a *Bacillus megaterium* WS06. Chin J Biotech, 2008, 24(10): 1740–1746 (in Chinese).  
吴襟, 张树政. 巨大芽孢杆菌  $\beta$ -淀粉酶基因的克隆、表达和酶学性质分析. 生物工程学报, 2008, 24(10): 1740–1746.
- [15] Nanmori T, Nagai M, Shimizu Y, et al. Cloning of the  $\beta$ -amylase gene from *Bacillus cereus* and characteristics of the primary structure of the enzyme. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(2): 623–627.
- [16] Lee JS, Wittchen KD, Stahl C, et al. Cloning, expression, and carbon catabolite repression of the *bamM* gene encoding  $\beta$ -amylase of *Bacillus megaterium* DSM319. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 56(1/2): 205–211.
- [17] Wijma HJ, Floor RJ, Jekel PA, et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization.



- Protein Eng Des Sel, 2014, 27(2): 49–58.
- [18] Bankar SB, Jadhav SB, Singhal RS. Poly- $\epsilon$ -lysine amylase conjugates to increase the stability of enzyme. Food Biosci, 2014, 5: 85–90.
- [19] Wang JL, Liu S, Du GC, et al. Construction and fermentation optimization of a recombinant *Bacillus subtilis* producing alkaline amylase. J Food Sci Biotechnol, 2016, 35(3): 296–302 (in Chinese).  
王静丽, 刘松, 堵国成, 等. 产碱性淀粉酶重组枯草芽孢杆菌的构建与发酵优化. 食品与生物技术学报, 2016, 35(3): 296–302.
- [20] Ren HZ, Madison JT, Thompson JF. Identification of an ethanol-soluble protein as  $\beta$ -amylase and its purification from soybean seeds. Phytochemistry, 1993, 33(3): 535–539.
- [21] Liu YH, Fan S, Liu XG, et al. A highly active alpha amylase from *Bacillus licheniformis*: directed evolution, enzyme characterization and structural analysis. J Microbiol Biotechnol, 2014, 24(7): 898–904.
- [22] Ben Mabrouk S, Zouari Ayadi D, Ben Hlima H, et al. Thermostability improvement of maltogenic amylase MAUS149 by error prone PCR. J Biotechnol, 2013, 168(4): 601–606.
- [23] Qin JF, Gao WW, Li Q, et al. Improvement of thermostability of  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 through *in vitro* evolution. Chin J Biotech, 2010, 26(9): 1293–1301 (in Chinese).  
秦久福, 高威威, 李崎, 等. 通过体外分子进化技术提高淀粉液化芽孢杆菌 BS5582  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1293–1301.
- [24] Seeliger D, de Groot BL. Protein thermostability calculations using alchemical free energy simulations. Biophys J, 2010, 98(10): 2309–2316.

(本文责编 郝丽芳)