

• 综 述 •

普鲁兰酶的异源表达、结构解析及分子改造研究进展

黄婷婷, 张玉华, 段绪果

南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037

黄婷婷, 张玉华, 段绪果. 普鲁兰酶的异源表达、结构解析及分子改造研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4432-4448.
HUANG TT, ZHANG YH, DUAN XG. Advances in heterologous expression, structural elucidation and molecular modification of pullulanase. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4432-4448.

摘 要: 淀粉是由葡萄糖单元通过 α -1,4-葡萄糖苷键和 α -1,6-葡萄糖苷键连接而成, 不仅是食物的主要成分, 也是淀粉深加工工业的基本原料来源。普鲁兰酶能够高效水解淀粉分子中的 α -1,6-葡萄糖苷键, 与其他的淀粉加工酶复合使用, 能够有效提高淀粉的利用率, 在淀粉深加工工业中具有“提质增效”的重要作用。本文综述了普鲁兰酶产酶菌株的筛选及编码基因的克隆表达, 总结了表达元件及发酵条件优化对普鲁兰酶产酶水平的影响, 探讨了普鲁兰酶结构解析及分子改造等方面的研究进展。同时分析了当前研究中存在的问题, 并对未来的研究进行了展望, 以期为普鲁兰酶的研究及应用提供参考和启示。

关键词: 普鲁兰酶; 异源表达; 蛋白结构解析; 分子改造

Advances in heterologous expression, structural elucidation and molecular modification of pullulanase

HUANG Tingting, ZHANG Yuhua, DUAN Xuguo

College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

Abstract: Starch is composed of glucose units linked by α -1,4-glucoside bond and α -1,6-glucoside bond. It is the main component of foods and the primary raw material for starch processing industry. Pullulanase can effectively hydrolyze the α -1,6-glucoside bond in starch molecules. Combined with other starch processing enzymes, it can effectively improve the starch utilization rate. Therefore, it has

Received: July 8, 2022; **Accepted:** September 5, 2022; **Published online:** September 8, 2022

Supported by: Nanjing Forestry University Youth Talent Support Program (GXL2018010); Jiangsu Overseas Visiting Scholar Program for Prominent Young and Middle-Aged University Teachers and Presidents (2020)

Corresponding author: DUAN Xuguo. E-mail: xgduan@njfu.edu.cn

基金项目: 南京林业大学青年拔尖人才培养计划项目 (GXL2018010); 江苏省高校优秀中青年教师和校长境外研修计划项目 (2020)

been widely used in the starch processing industry. This paper summarized the screening of pullulanase-producing strain and its encoding genes. In addition, the effects of expression elements and fermentation conditions on the production of pullulanase were summarized. Moreover, the progress in crystal structure elucidation and molecular modification of pullulanase was discussed. Lastly, future perspectives on pullulanase research were proposed.

Keywords: pullulanase; heterologous expression; protein structure elucidation; molecular modification

淀粉是食物中最主要的营养成分之一,也是淀粉深加工工业的原料来源,在国民经济中占有重要的地位。淀粉分子由成百上千的葡萄糖单元通过 α -1,4-葡萄糖苷键和 α -1,6-葡萄糖苷键连接而成。其中, α -1,6-葡萄糖苷键尽管只占总糖苷键的6%左右,却使淀粉分子形成非常复杂的分支链状结构,阻碍了常用淀粉加工酶(如 α -淀粉酶、糖化酶、 β -淀粉酶、葡萄糖基转移酶等)对底物的转化,导致原料利用率低和反应周期长等问题。因此,淀粉加工过程通常需要复配添加普鲁兰酶对 α -1,6-葡萄糖苷键进行水解。

普鲁兰酶是一种淀粉脱支酶,根据其底物特异性将其分为I型普鲁兰酶(EC 3.2.1.41)与II型普鲁兰酶(EC 3.2.1.1/41)。I型普鲁兰酶水解 α -1,6-葡萄糖苷键,II型普鲁兰酶水解 α -1,4与 α -1,6-葡萄糖苷键。I型普鲁兰酶属于糖苷水解酶GH13家族,只能水解淀粉及糊精分子中的 α -1,4-葡萄糖苷键。II型普鲁兰酶又称淀粉普鲁兰酶,被两个糖苷水解酶家族涵盖,即GH57家族和GH13家族。II型普鲁兰酶既可以水解 α -1,6-葡萄糖苷键,又可以水解线性和分支结构的 α -1,4-葡萄糖苷键。

迄今为止,普鲁兰酶已在多种微生物中发现并鉴定,但大多数已报道野生型普鲁兰酶仍然存在稳定性差、发酵酶活低与应用性能不佳等不足。针对上述问题,近年来普鲁兰酶的研究主要集中于新编码基因的克隆表达、表达系

统优化以及酶分子改造等。除新产酶菌株的筛选及编码基因的克隆表达以外,基于生物信息数据库来源的普鲁兰酶编码基因的挖掘逐渐成为主要研究趋势。表达系统的优化主要包括宿主菌株的改造、表达元件的筛选与优化以及发酵条件优化等。普鲁兰酶的分子改造方面,半理性改造仍然是当前研究的主流,但是随着蛋白结构设计方法的快速更迭,酶的人工设计将成为普鲁兰酶性能改善的有力手段。

本文系统地介绍了普鲁兰酶的基因来源、异源表达、表达系统优化以及酶分子改造等方面的研究进展。同时分析了当前研究中存在的问题,并对未来的研究进行了展望,以期为普鲁兰酶的研究及应用提供参考和启示。

1 普鲁兰酶的来源

1.1 产普鲁兰酶的野生菌株筛选

国内外关于普鲁兰酶的研究已有60多年的历史。植物与微生物均可产生普鲁兰酶,其中植物来源普鲁兰酶又叫作R酶或者极限糊精酶。由于微生物普鲁兰酶具有独特的优势,是普鲁兰酶研究的重点。1961年,Bender和Wallenfels通过培养产气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)首次获得了微生物普鲁兰酶^[1]。1980年丹麦的Novo Nordisk公司获得一株嗜酸普鲁兰芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*),该来源的普鲁兰酶是目前应用最广、产量最大的普鲁兰酶,它的最适温度和最适pH分别为

60.0 °C 和 5.0^[2]。

近年来, 学者们从不同的微生物中发现了具有不同生化特征的普鲁兰酶 (表 1)。主要产酶菌株有厌氧芽孢杆菌 (*Anoxybacillus* sp.) LM18-11^[5]、*B. acidopullulyticus*^[7]、脱支芽孢杆菌 (*Bacillus deramificans*)^[9]、长野芽孢杆菌 (*Bacillus naganoensis*) JNB-1^[12]等。大多数 I 型普鲁兰酶的最适温度在 40.0–70.0 °C, 属于中温酶 (表 1)。如从厌氧菌戈特沙尔克厌氧分支杆菌 (*Anaerobranca gottschalkii*)^[4]鉴定出的普鲁兰酶的分子量为 96.0 kDa, 在 pH 8.0 和 70.0 °C 时水解活性最佳, 最适条件下半衰期为 22.0 h。从臭豆腐盐水中分离鉴定出蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus* Nws-bc5)^[8], 其产生的普鲁兰酶的分子量为 81.4 kDa, 最适 pH 和最适温度分别为 6.0 和 40.0 °C, 并且在碱性条件下显示出更高的稳定性, Ca²⁺可显著提高其活性。芽孢杆菌 (*Bacillus flavocaldarius*)^[10]普鲁兰酶分子量为 95.0 kDa, 在 pH 5.0 和 80.0 °C 下显示最佳活性, 比活性为 25.9 U/mg, 表现出良好的 pH 稳定性和热稳定性。此外, 具有高催化活性和稳定性的嗜冷型普鲁兰酶因其在生淀粉低温水解中的广泛应用而受到特别关注。Rajaei 等^[15]从微小杆菌 (*Exiguobacterium* sp.) SH₃ 中鉴定的 I 型普鲁兰酶, 其最适温度与最适 pH 值分别为 45.0 °C 和 8.5, 在 pH 4.0–11.0 范围内具有极强的耐受性。该酶能够水解支链淀粉、可溶性淀粉、马铃薯淀粉和米粉, 且在两种商用洗涤剂 Rika (7.5%, V/V) 和 Fadisheh (2.5%, W/V) 中保存 10 d 后, 该酶仍能保持 54.5% 和 85.0% 的活性。II 型普鲁兰酶主要来自嗜热微生物, 该类型酶的分子量大多在 100.0 kDa 以上, 最适温度为 55.0–100.0 °C。产 II 型普鲁兰酶的微生物有细菌 (如嗜淀粉乳杆菌 (*Lactobacillus amylophilus*) GV6^[17]、嗜热地芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoleovorans*) NP33^[19]) 和

古细菌 (如沃氏火球菌 (*Pyrococcus woesei*)^[18]、火球菌 (*Pyrococcus yayanosii*) CH1^[20])。表 1 中的多数 II 型普鲁兰酶的最适温度在 90.0–100.0 °C 之间, 例如来源于 *P. yayanosii* CH1^[14] 的 PulPY, 最适温度在 95.0 °C, 可以在淀粉液化过程中与 α -淀粉酶结合使用, 以提高淀粉底物的水解效率。

由于 I 型 II 型普鲁兰酶在水解糖苷键特异性方面的差异, 当面对相同的底物, 产生的产物可能相同也可能不同。其水解反应首先酸碱催化促使某些基团解离, 酶分子通过盐键或共价键稳定酶—底物的过渡态中间物, 然后酶分子的异头物活性中心攻击水分子从而断裂过渡态中间物, 形成具有保留立体结构的半缩醛产物。如图 1 所示, 当 I 型 II 型普鲁兰酶同时水解普鲁兰多糖时, 由于普鲁兰多糖是一个由 α -1,6-糖苷键连接的麦芽三糖, 产生的产物是相同的。当底物为支链淀粉时, I 型普鲁兰酶通常释放聚合度在 2 以上的葡萄糖寡糖作为最终产物, 而 II 普鲁兰酶则可以观察到葡萄糖、麦芽糖和麦芽三糖的生成。

1.2 生物信息数据库来源的普鲁兰酶编码基因的筛选鉴定

如上所述, 普鲁兰酶可从筛选的微生物中获得, 但该方法周期长且易受环境影响。近年来随着全球微生物模式基因组计划的实施, 大量基因组数据被解析并提交基因组数据库, 为新型普鲁兰酶的发现提供了新的来源。如 Thakur 等^[24]在 CAZy 数据库 (<http://www.cazy.org>) 中通过蛋白水平上与同源 I 型普鲁兰酶的相似性, 从锡金喜马拉雅山 Reshi 温泉的宏基因组序列数据中, 鉴定出一种新型的 I 型支链淀粉酶 (Pul_M), 该菌在 40.0 °C 和 pH 6.0–7.0 时表现出最佳的活性, 在 4.0 °C 的低温下仍然保留超过 50.0% 的酶活性, 是一种适冷 I 型普鲁兰酶。

表 1 不同微生物来源的普鲁兰酶及性质
Table 1 Pullulanase from different microbiological sources and its properties

Enzyme	Classification	Microorganism	Molecular mass (kDa)	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	Specific activity (U/mg)	References
pulSL3	Type I	<i>Alkalibacterium</i> sp. SL3	226.2	50.0	9.0	14.2	[3]
rPulAg	Type I	<i>Anaerobranca gottschalkii</i>	96.0	70.0	8.0	—	[4]
PulA	Type I	<i>Anoxybacillus</i> sp. LM18-11	—	60.0	6.0	750.0	[5]
PulASK	Type I	<i>Anoxybacillus</i> sp. SK3-4	80.0	60.0	6.0	—	[6]
BaPul	Type I	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	—	60.0	5.0	—	[7]
pul _{bc}	Type I	<i>Bacillus cereus</i> Nws-bc5	81.4	40.0	6.0	44.7	[8]
PulBd	Type I	<i>Bacillus deramificans</i>	79.0	55.0	4.5	—	[9]
FN-pul	Type I	<i>Bacillus flavocaldarius</i> Rt17-B1	95.0	80.0	5.0	25.9	[10]
PulPB1	Type I	<i>Bacillus methanolicus</i> PB1	83.0	50.0	5.5	292.2	[11]
BaPUL	Type I	<i>Bacillus naganoensis</i> JNB-1	119.0	62.5	4.5	—	[12]
Pul3YH5	Type I	<i>Exiguobacterium Acetylicum</i> YH5	95.8	50.0	6.0	—	[13]
PY22pul	Type I	<i>Bacillus subtilis</i> PY22	90.0	40.0	6.0	—	[14]
Pul-SH3	Type I	<i>Exiguobacterium</i> sp. SH3	110.0	45.0	8.5	20.3	[15]
pulGK	Type I	<i>Geobacillus kaustophilus</i> DSM7263	80.6	65.0	6.0	64.7	[16]
AP	Type II	<i>Streptomyces erumpens</i> MTCC 7317	45.0	50.0	7.0	98.8	[17]
Pul Pw	Type II	<i>Pyrococcus woesei</i>	90.0	100.0	6.0	35.0	[18]
gt-apu	Type II	<i>Geobacillus thermoleovorans</i> NP33	182.0	60.0	7.0	851.0	[19]
Pul _{py}	Type II	<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1	138.0	95.0	6.6	32.2	[20]
APU	Type II	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>	111.0	95.0	5.5	73.2	[21]
Apu-Tk	Type II	<i>Thermococcus kodakarensis</i> KOD1	120.0	100.0	5.0–5.5	—	[22]
Pul Te	Type II	<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> 39E	140.0	60.0	5.5	480.0	[23]

—: not reported.

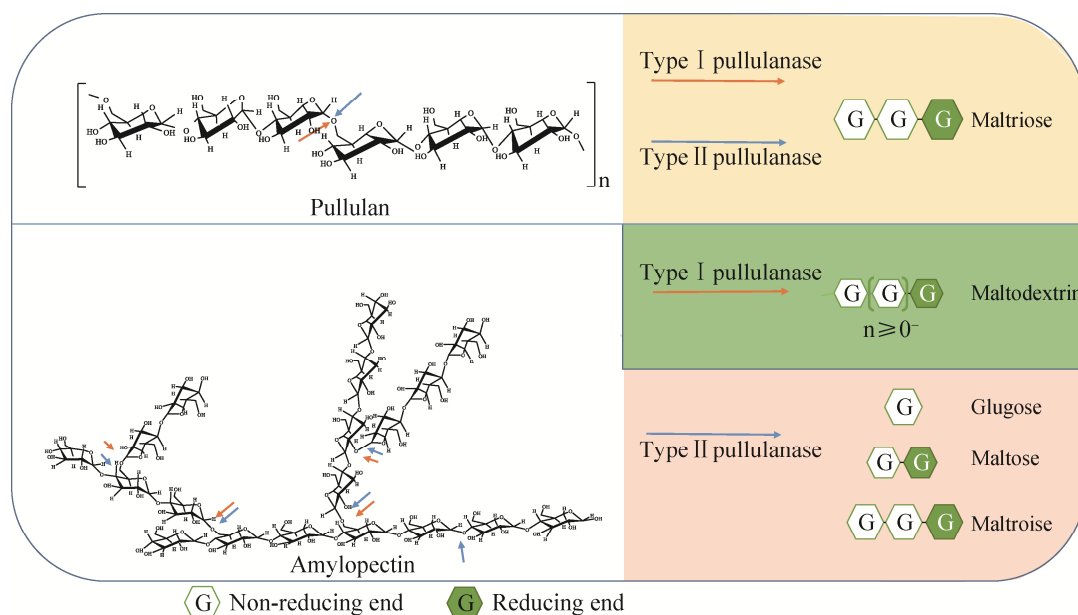


图 1 I 型普鲁兰酶与 II 型普鲁兰酶对普鲁兰多糖与支链淀粉作用特征示意图 I 型普鲁兰酶和 II 型普鲁兰酶作用位点分别用红色与蓝色箭头表示

Figure 1 Schematic diagram of the effects of type I and II pullulanases on pullulan polysaccharides and amylopectin. The targets of type I and type II pullulanases are indicated by red and blue arrows, respectively.

除了 CAZy 数据库以外,还可以从 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) 以及 Genomes 在线数据库 (GOLD) (<https://gold.jgi.doe.gov>) 等数据库中筛选获得具有不同特性的普鲁兰酶。数据库筛选时,可以根据非冗余序列的数量,设置一定的相似度截止值以缩小搜索范围,提高筛选效率。此外还可以使用蛋白结构预测工具 (例如 AlfaFold2、RoseTTAFold、Swiss-Model 等) 对潜在酶蛋白进行结构模拟以获得酶的三维结构模型。这些结构模型经过能量优化后再与配体分子对接,可以有效地发现具有所需功能特征的新酶,进一步提高筛选的准确度,减少盲目性。

2 普鲁兰酶的重组表达及发酵优化

2.1 普鲁兰酶的重组表达

由于野生菌株大多产酶水平偏低,一般不

能满足工业生产的要求,酶蛋白的异源重组表达是解决这一问题的有力手段。至今,已有大量普鲁兰酶编码基因被克隆和异源重组表达。如表 2 所示,普鲁兰酶常用表达宿主有大肠杆菌^[33]、枯草芽孢杆菌^[34]和毕赤酵母^[29]等。普鲁兰酶的重组表达研究中,可以采取宿主菌株改造、表达元件优化以及发酵条件优化等进一步提高重组普鲁兰酶的产量。

普鲁兰酶的异源表达宿主包括真核宿主和原核宿主。其中,毕赤酵母表达系统是应用最为广泛的真核表达宿主。该系统具有遗传背景清晰、发酵工艺成熟、产物易分离纯化等优点,已被广泛用于外源蛋白的异源表达。据报道,*B. naganoensis* (ATCC 53909) 普鲁兰酶在毕赤酵母 SMD1168 中表达,最高酶活为 507.0 U/mL^[35]。王兵波等^[29]根据毕赤酵母甲醇氧化酶基因的密码子使用频率优化了

B. deramificans 普鲁兰酶编码基因的密码子, 在最优条件下重组菌胞外酶活可达 2 031.0 U/mL。但是, 由于毕赤酵母为真核细胞, 存在翻译后修饰以及密码子偏好性等特点, 而普鲁兰酶一般来自于细菌, 在毕赤酵母中的异源表达的产量和成功率相对较低, 目前研究相对较少。

在原核表达系统中, 大肠杆菌表达系统是研究最为成熟的表达系统。大肠杆菌具有操作简单、遗传背景清楚、繁殖快、表达量高、成本低等优点。Duan 等^[36]将 *B. deramificans* 普鲁兰酶在大肠杆菌 BL21(DE3) 中重组表达, 3 L 发酵罐中使用两步流加策略和优化的发酵条件 (诱导温度 25.0 °C, 补加 20.0 mmol/L 甜菜碱) 将普鲁兰酶胞内产量提高至 963.9 U/mL, 是对照菌株的 8.3 倍。但胞外上清酶活却只有 17.4 U/mL, 大部分重组蛋白积累在周质间隙。Chen 等^[37]通过比较不同的大肠杆菌表达系统来提高 BaPul13A 的可溶性表达水平, 以 pET22b(+) 为表达载体, 在 5 L 发酵罐中逐步降低温度, BaPul13A 总酶活性最高, 达 1 156.3 U/mL。Zou 等^[34]在 3 L 发酵罐上通过优化诱导模式和甘氨酸补料策略, 普鲁兰酶总活力和胞外活力分别为 2 523.5 和 1 567.9 U/mL, 分别比优化前提高了 1.2 和 22.6 倍。

研究发现, 大肠杆菌中重组表达普鲁兰酶

仍然存在几个突出问题, 如: 易产生包涵体、胞外分泌效率差^[38]以及影响重组菌株生长。首先, 普鲁兰酶易形成包涵体的可能原因有: 普鲁兰酶的过快表达, 使得酶无法正确折叠; 大肠杆菌细胞质中的氧化还原势低; 折叠酶和分子伴侣有限等。其次, 普鲁兰酶在大肠杆菌中胞外分泌效率偏低的可能原因有: 普鲁兰酶蛋白分子量大且为多聚体, 在大肠杆菌中表达时首先定位于周质空间, 然后需要跨外膜才能分泌到培养基中, 该过程效率低, 影响其分泌效率。此外, 普鲁兰酶的表达对重组菌株产生“毒性”并影响其生长的可能原因, 外源蛋白本身在宿主中会造成代谢负担以及形成包涵体, 因此工程菌株启动自然应激反应机制发生退化并处于“VBNC”状态 (细胞是一种活的但不可培养的状态)。为了恢复活力与功能, 菌株通常会适应并重新调整其基因表达和随后的代谢, 从而影响自身的生长与普鲁兰酶的生产。因此更高效、更具成本效益的生物过程与设计改造合适的宿主被探索以应对大肠杆菌的退化^[39]。Chen 等^[40]开发了一种高效的策略来筛选稳定产生胞外蛋白的大肠杆菌, 所筛选菌株胞外普鲁兰酶活力、细胞生物量高度相似分别为 30.0 U/mL 和 9.0 g DCW/L。安展飞等^[41]采用过表达人工设计的 *micA* 反义 sRNA *anti-micA* (*bprO*、*omU*)

表 2 普鲁兰酶的异源表达及发酵制备

Table 2 Heterologous expression and fermentive production of pullulanase

Source	Host	Vector	Fermentation scale	Production (U/mL)	Reference
<i>Bacillus acidpullulyticus</i>	<i>B. subtilis</i>	pCBS	50 L fermentor	1 555.0	[25]
<i>Bacillus naganoensis</i>	<i>B. subtilis</i>	pDL	Flask	102.7	[26]
<i>B. subtilis</i> WS5	<i>B. subtilis</i>	pHYPULd4	3 L fermentor	5 951.8	[27]
<i>Anoxybacillus</i> sp. WB42	<i>B. subtilis</i>	pP ₄₃	5 L fermentor	269.1	[28]
<i>Bacillus deramificans</i>	<i>Pichia pastoris</i>	pPIC9K	5 L fermentor	2 031.0	[29]
<i>B. deramificans</i>	<i>B. subtilis</i> WS9	pHYPULd4	3 L fermentor	8 037.9	[30]
<i>B. naganoensis</i> JNB-1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET-22b(+) <i>pul</i>	Flask	580.0	[31]
<i>B. naganoensis</i>	<i>B. subtilis</i>	pBEPUL01	Flask	625.5	[32]
ATCC 53909	ATCC 6051Δ10				

阻断 *micA* 对 *ompA* 的沉默, 进而阻断 sigma E 介导的细胞自溶信号转导途径, 提高了大肠杆菌的存活力和普鲁兰酶表达量, 为解决大肠杆菌退化提供了新的思路。

此外, 大肠杆菌为革兰氏阴性菌, 能够产生内毒素, 在食品酶的生产中存在安全风险。因此, 迫切需要开发能够安全高效、可溶性表达普鲁兰酶的表达系统。

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌, 不产生内毒素; 不但遗传背景清晰、基因操作技术成熟, 而且具有强大的蛋白分泌能力, 非常适合食品酶的异源表达。此外, 枯草芽孢杆菌还具有无明显密码子偏好性以及产物易纯化等优势, 非常适合工业应用。但是, 枯草芽孢杆菌能够本底表达多种蛋白酶, 当普鲁兰酶在枯草芽孢杆菌中表达时, 容易被上述蛋白酶所水解, 导致目的蛋白稳定性偏低。针对这些问题, 可以敲除宿主自身蛋白酶编码基因, 可以减少重组蛋白的降解, 增加其分泌表达量。Liu 等^[32]将枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis* ATCC 6051) 宿主进行改造, 删除了 8 种胞外蛋白酶 (*aprE*, *nprE*, *nprB*, *epr*, *mpr*, *bpr*, *vpr* 和 *wprA*), 优化后胞外酶活性达到 625.5 U/mL。Zhang 等^[27]用 pHYPULd4 表达载体, 敲除蛋白酶编码基因 $\Delta nprE$ 、 $\Delta aprE$ 、 $\Delta nprB$ 、 Δbpr 、 Δmpr 和 Δepr , 重组菌在 3 L 发酵罐中胞外酶活性达到 2 449.6 U/mL。此外, 修饰宿主菌株的细胞壁、改变细胞壁的通透性也是提高酶蛋白表达量的途径之一。在枯草芽孢杆菌中, 其细胞壁由肽聚糖、磷壁酸、共价连接的阴离子聚合物和蛋白质等组成。磷壁酸使枯草芽孢杆菌的细胞壁具有高负电荷密度, 从而导致金属阳离子与肽的结合, 这些金属离子能够促进分泌蛋白在易位后迅速折叠, 从而促进了普鲁兰酶的正确折叠和分泌。Zhang 等^[30]通过敲除表达宿主 *B. subtilis* WS9 的 *dltB* 基因,

增强细胞壁的负电荷。改造后菌株 WS9DPUL 的胞外普鲁兰酶活性达到 206.0 U/mL, 比对照提高了 1.5 倍; 敲除前后重组菌株对应的菌体干重 DCW (dry cell weight) 值都在 3.5 g/L 左右, 对生长没有明显影响。

2.2 表达元件优化对普鲁兰酶重组表达的影响

除了表达宿主之外, 研究发现表达元件对外源基因的表达水平同样具有重要影响。其中, 启动子、信号肽、增强子等表达元件的优化, 是目前普鲁兰酶重组表达的研究热点^[42]。

(1) 不同启动子启动转录的能力不同, 对蛋白表达水平有重要影响, 是表达元件改造的重点^[43]。启动子改造研究包括启动子的筛选和串联启动子以增强蛋白的表达。筛选高效的单启动子是提高普鲁兰酶表达的有效方法。Song 等^[44]用 P_{P43} 替代 P_{HpaII} 来启动普鲁兰酶 BnPul 在 WB800 中的表达, 酶活由 3.9 U/mL 提高至 8.7 U/mL。Wang 等^[45]以 WB600 为表达宿主, 使用半定量 RT-PCR 方法, 分别考察 3 个常用启动子 (P_{P43} 、 P_{apr} 和 P_{amy}) 对普鲁兰酶 pulB 转录水平的影响。结果显示, 以 P_{apr} 为启动子时, 普鲁兰酶 pulB 的转录水平高于 P_{amy} 和 P_{P43} , 说明前者能够更有效地驱动 pulB 的转录。此外, 还可以构建串联启动子来进一步提高普鲁兰酶的表达。Meng 等^[35]先基于转录组和生物信息学数据在枯草芽孢杆菌中挖掘出 10 个高活性的单启动子, 然后构建了双启动子和三启动子重组菌株, 其中含有 $P_{sodA+fusA}$ (163.0 U/mL) 和 $P_{sodA+fusA+amyE}$ (336.0 U/mL) 的菌株活性最高, 分别是含有单启动子 P_{amyE} 菌株酶活力的 2.3 倍和 4.7 倍。Liu 等^[41]以枯草芽孢杆菌 ATCC 6051 Δ 10 突变体为宿主, 构建了 11 个具有单启动子的质粒和 16 个双启动子质粒, 结果显示含有双启动子 P_{amyL} - P_{spovG} 质粒的普鲁兰酶表达量

最高,胞外酶活达到 625.5 U/mL。

(2) 信号肽能够引导胞外蛋白的跨膜运输,对普鲁兰酶的分泌表达也有重要影响。Wang 等^[46]发现大肠杆菌细胞中有效分泌的蛋白质通常在 N 端有酸性氨基酸残基,于是在 PelB 信号肽的 N 端融合重复的 7 个 Asp 标签来改善普鲁兰酶蛋白质的分泌,胞外酶活从 18.0 U/mL 升高到 70.0 U/mL,提高了 4.0 倍。

与大肠杆菌相比,枯草芽孢杆菌缺乏外膜结构,信号肽在保证分泌蛋白的正确定位和转运中同样起到重要作用。Wang 等^[45]研究了 4 个信号肽对普鲁兰酶蛋白在枯草芽孢杆菌表达效率的影响,发现分泌效率依次为 $SP_{sacB} > SP_{amy} > SP_{aprs} > SP_{aprl}$ 。其中,启动子信号肽组合 $P_{apr}-SP_{sacB}$ 可使普鲁兰酶分泌表达效率最高,酶活为 2.8 U/mL,约为原菌株 (0.4 U/mL) 的 6.7 倍。Zhang 等^[39]采用高通量的方法筛选在枯草芽孢杆菌中比对了 173 个信号肽对普鲁兰酶分泌表达的影响,发现信号肽 *ywtF* 效果最好,比对照菌株酶活性增加 12.0%。

(3) 增强子是顺式作用元件的一种,可以提高蛋白的表达水平。Deng 等^[47]将含有增强子 *degQ* 的重组质粒 pMA0911- P_{sacB} -*pul* 转化到枯草芽孢杆菌中表达,发现增强子 *degQ* 对普鲁兰酶的表达具有正向调控作用,酶活从 4.5 U/mL 提高到 7.2 U/mL。此外,将 *degQ* 基因插入到离启动子 P_{sacB} 更近的位置,可以进一步将酶活力提高至 12.0 U/mL。

(4) mRNA 的二级结构会影响自身稳定性以及与核糖体的结合效率,对重组酶的表达也有重要影响。众所周知,5'非翻译区 (UTR) 序列和 3'UTR 序列是 mRNA 稳定性的决定因素。在大肠杆菌中 5'UTR 的 SD 序列可以增加 mRNA 的稳定性,并且提高核糖体亚基与 mRNA 之间的亲和力,最终增加酶的表达水

平。Li 等^[48]在 *pulA* 编码基因的 5'UTR 端增加 SD 序列,在 3'UTR 处增加茎环结构后,通过半定量 RT-PCR 测定发现表达宿主 BL21(DE3) 中普鲁兰酶的 mRNA 转录水平增加了 3.4 倍,胞外酶活与胞内酶活分别提高了 107.0 倍和 584.1 倍。

2.3 发酵条件优化对普鲁兰酶重组表达的影响

发酵条件和培养基配方在重组菌株的培养中至关重要,为了改善普鲁兰酶的表达水平,研究人员在该方面进行了大量的研究。

在大肠杆菌发酵过程中,补充添加剂 (如甘氨酸和 Triton X-100) 可以提高表达宿主普鲁兰酶的分泌效率^[49]。Nie 等^[40]发现培养基中添加 0.6% 的甘氨酸时,大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-22b(+)-*pul* 的胞外普鲁兰酶活性达到 502.0 U/mL。Duan 等^[50]在摇瓶和 3 L 发酵罐条件下考察了表面活性剂对大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-24-ompA/*pulA* 普鲁兰酶分泌的影响,在 3 L 发酵罐中发酵 40.0 h 时添加 0.5% Triton X-100 时,胞外普鲁兰酶活力和分泌率分别为 812.4 U/mL 和 86.0%。

发酵条件优化对芽孢杆菌发酵产酶水平同样具有重要影响^[51]。Zhang 等^[36]通过在 3 L 发酵罐中考察了发酵条件对 WB800- P_{Hpall} -*pul* 普鲁兰酶分泌的影响,发现优化后的重组枯草杆菌的 OD_{600} 和酶活分别为 84.5 和 102.8 U/mL,分别比优化前提高了 141.0% 和 144.0%。Zou 等^[52]通过摇瓶培养基和培养条件优化后,*B. deramificans* 来源的普鲁兰酶通过桥石短芽孢杆菌 (*Brevibacillus choshinensis*) 在摇瓶中表达,活力从开始在 2SY 培养基中的 24.3 U/mL 提高到 542.9 U/mL,3 L 发酵罐中的活性为 1 005.8 U/mL。此外,Zou 等^[53]发现当培养基中添加 $MgCl_2$ 或 $MgSO_4$ 培养 *B. choshinensis*

产生普鲁兰酶时, 酶活分别为 543.0 U/mL 和 534.0 U/mL, 比对照提高了 5.4 倍和 5.3 倍。

3 普鲁兰酶的结构解析及分子改造

3.1 普鲁兰酶的结构解析

普鲁兰酶结构的解析是探究其催化机制进而对其进行分子改造的基础。从 2006 年肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumonia*) 普鲁兰酶 (KPP) 的三维晶体结构被首次报道以来, 已经有 48 个普鲁兰酶的晶体结构被解析。其中 I 型普鲁兰酶有 34 个, II 型普鲁兰酶有 14 个。对比发现, 不同来源的 I 型普鲁兰酶蛋白结构具有高度相似性, 但是不同来源的 II 型普鲁兰酶蛋白结构之间有较大的差别。如图 2 所示, 分别是 I 型普鲁兰酶 (图 2A, 2B, 2C) 与 II 型普鲁兰酶 (图 2D, 2E) 的蛋白三维结构。

I 型普鲁兰酶蛋白结构一般包含 A 结构域、C 端结构域和 N 端结构 (N 端结构通常由多个结构域组成)。A 结构域为催化结构域, 具有 GH13 家族共有的 $(\beta/\alpha)_8$ 结构。C 端结构域是 α 淀粉酶家族共有的希腊钥匙型反平行 β 桶, 包含内外两层 $(5\beta/3\beta)\beta$ 折叠, C 端结构域通过内层 5β 折叠与催化结构域 A 的疏水基序相互作用, 进而稳定 A 结构域的活性构象。不

同来源的 I 型普鲁兰酶其 N 端结构均由多个结构域共同组成, 且存在一定差异。如图 1 所示, 来源于 *B. acidopullulyticus* 的 I 型普鲁兰酶的 N 端结构由 CBM48、X25 和 X45 共同组成 (图 2A)^[54]。*Anoxybacillus* sp. LM18-11 I 型普鲁兰酶晶体结构中发现其 N 端结构中含有 CBM68 和 CBM48 (图 2B)^[55]。其中, CBM68 结构域能专一性结合麦芽三糖或麦芽四糖; CBM48 的主要功能为稳定 A 结构域的结构。肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) ATCC 9621 I 型普鲁兰酶 (图 2C) 的催化结构域与其他 I 型普鲁兰酶结构非常类似, 其 N 端结构由 CBM41、CBM48 以及 N2 结构域组成^[56], 与其他来源的酶略有不同。

II 型普鲁兰酶分布在 GH13 家族和 GH57 家族, 其中已经解析的 14 个 II 型普鲁兰酶均属于 GH13 家族。如图 2D 所示, 嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) II 型普鲁兰酶包含 N、A、B、C 结构域^[57]。其中, 结构域 A 为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构, 但是与理想的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构相比, 第 5 条 α 螺旋和第 6 条 β 链是不完整的。该酶的结构域 B 很小, 只包含一个圈半的 α -螺旋, 据推测其 C 端结构域可能与该酶的分泌或稳定性有关。图 2E 为来源于布氏瘤

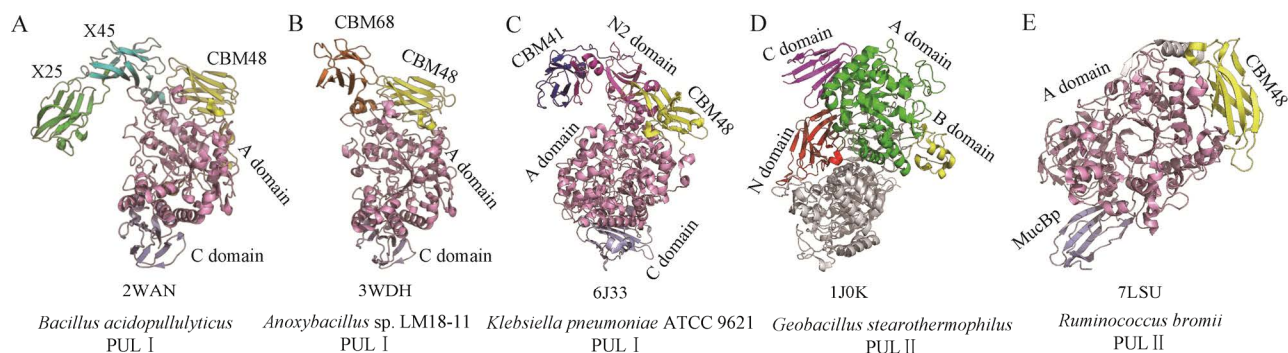


图 2 几种典型的 GH13 I 型普鲁兰酶 (A、B、C) 和 GH13 II 型普鲁兰酶 (D、E) 结构域组成的比较
Figure 2 Comparison of domain composition of several typical GH13 type I pullulanases (A, B, C) and GH13 type II pullulanases (D, E)

胃球菌 (*Ruminococcus bromii*) 的 II 型普鲁兰酶 Amy12^[58], 该酶由 N 端结构域 CBM48、A 结构域和 C 端黏蛋白结合蛋白 (MucBP) 模块组成。其中, A 结构域为 GH13 家族典型的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶结构。C 端的 MucBP 结构域虽然与 CBM 具有相似性, 但其功能仍不清楚。GH57 家族的 II 型普鲁兰酶的精确三维结构目前尚未解析。但根据 NCBI 保守域搜索分析, 来源于 *P. yayanosii* CH1 的 Pully 主要包含 4 个结构域。分别是结构域 COG1449、N 端催化结构域、C 端结构域和一个常见于周质蛋白中的 COG3889。

I 型普鲁兰酶与 II 型普鲁兰酶的活性中心及关键催化残基与其所属 GH 家族密切相关, 且具有如下规律。GH13 家族 I 型普鲁兰酶和 GH13 家族 II 型普鲁兰酶的催化结构域均为 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构, 活性中心位于催化结构域中, 且其周围的残基通常是保守的。经过长期进化, 形成了 4 段保守序列区域 (CSR I、II、III 和 IV) (图 3), 这 4 段保守序列共同构成活性中心。此外, I 型普鲁兰酶还有一段独特的保守序列 motif1: “YNWGY”。其中, 3 个催化残基 β -4-asg (催化亲核试剂)、 β -5-glu (质子供体) 和 β -7-asg (过渡态稳定剂) 共同构成了 GH13 家族 I 型和

II 型普鲁兰酶活性中心的催化三联体。该催化三联体 Asp-Glu-Asp 分别位于 3 个保守基序 CSR II、CSR III 和 CSR IV 上, 催化底物分子中 α -1,6-葡萄糖苷键的水解。GH13 家族的 II 型普鲁兰酶还具有另外一个活性中心, 用于催化底物分子中 α -1,4 葡萄糖苷键的水解。与 GH13 家族酶不同, GH57 家族的 II 型普鲁兰酶具有一个双功能的催化活性中心, 可以同时催化底物分子中的 α -1,6-葡萄糖苷键与 α -1,4 葡萄糖苷键。其催化结构域为 $(\beta/\alpha)_7$ 桶状结构, 以 β -4-glu 为催化亲核试剂, β -7-asg 为质子供体。

3.2 普鲁兰酶的分子改造

普鲁兰酶作为一种工业酶, 主要与其他淀粉水解酶复配用于淀粉底物的糖化过程, 该过程对普鲁兰酶的性能 (耐热能力、耐酸能力和催化活力) 以及加酶量 (酶制剂所占成本) 均有较高要求。然而, 野生普鲁兰酶往往存在稳定性不足和活力不高的问题, 分子改造是解决上述问题的主要有效手段之一。

3.2.1 普鲁兰酶的定点突变改造

(1) 定点突变提高普鲁兰酶的耐热能力

近年来, 定点突变提高普鲁兰酶热稳定性改造方面的研究方面取得了较多进展。已报道

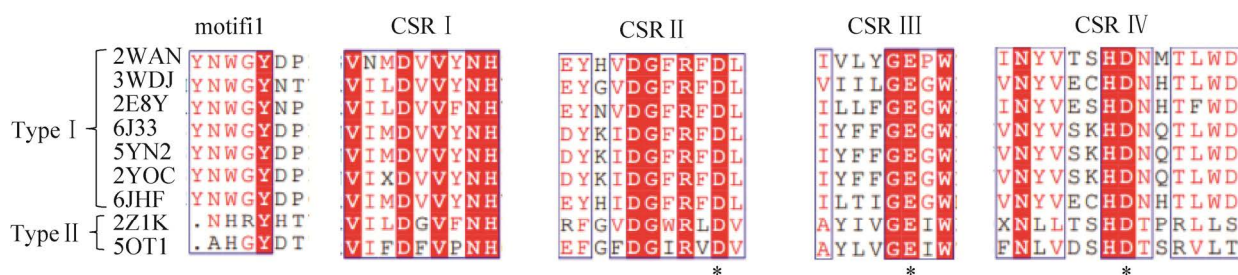


图3 GH13 家族的 I 型普鲁兰酶和 GH13 家族的 II 型普鲁兰酶保守基序 3 个保守催化残基用*号标记

Figure 3 The conserved motifs of GH13 type I pullulanases and GH13 type II pullulanases. Three conserved catalytic residues are marked with *. 2WAN: *Bacillus acidopullulyticus*; 3WDJ: *Anoxybacillus* sp. LM18-11; 2E8Y: *Bacillus subtilis* str. 168; 6J33: *Klebsiella pneumoniae* ATCC9621; 5YN2: *Klebsiella pneumoniae*; 2YOC: *Klebsiella oxytoca*; 6JHF: *Paenibacillus barengoltzii*; 2Z1K: *Thermus thermophilus* HB8; 5OT1: *Thermococcus kodakarensis*.

研究主要是在普鲁兰酶同源序列比对、结构分析的基础上,通过定点突变引入新的作用力比如疏水作用力、引入二硫键以及强离子键、脯氨酸策略等,从而提高蛋白分子结构的刚性,进而获得稳定性提升的突变体。

Bi 等^[59]使用分子动力学模拟,选择 Bt-Pul 结构中不稳定氨基酸残基进行虚拟饱和突变,结合 FoldX 分析以及 I-Mutant 3.0 和 dDFIRE 计算,筛选得到 17 个潜在的稳定突变体。再通过实验验证,最终构建得到最优突变体 G692M。该突变体 T_m 值提高了 3.8 °C,半衰期为 265.0 min,是野生酶的 2.1 倍。分析发现,该突变体热稳定性提高的原因,可能是高度疏水残基 M 的引入,促进了蛋白局部结构的稳定。Chang 等^[60]通过同源建模结合蛋白序列比对,对 *B. naganoensis* 普鲁兰酶进行定点突变,得到了 3 个稳定性提高的单突变, PulB-D328H、PulB-N387D 和 PulB-A414P。其中, PulB-D328H 和 PulB-N387D 为引入强离子键的突变体,突变体 PulB-A414P 引入了 1 个脯氨酸。将 3 个单突变进行组合突变,得到了组合突变体 PulB-328/387/414,组合突变体的 T_m 值提高了 5.0 °C,半衰期是野生酶的 12.9 倍。Pang 等^[61]对 *Anoxybacillus* sp. WB42 普鲁兰酶 PULA 同源建模,使用 GetArea 工具计算 PULA 表面赖氨酸和甘氨酸,应用二硫键设计平台预测二硫键,构建突变文库。通过筛选获得稳定远高于野生型 PulA 的突变体 PulAC。与野生酶 PulA 结构比较发现 PulAC 的 Cys245 与 Cys326、Cys651 与 Cys707 形成了新的二硫键,并且在 Arg419 与 Asp416 之间形成了新的氢键。

(2) 定点突变提高普鲁兰酶的耐酸能力

由于糖化条件具有高温、弱酸的特点,要求普鲁兰酶不仅具有较好的耐热能力,还应具有较好的耐酸能力。已报道研究主要在同源比

对、表面电荷优化以及设计改造分子间相互作用力的原理基础上,通过定点突变来改变活性中心的 pK_a 值、表面电荷与蛋白质内部的作用力比如氢键等来提高普鲁兰酶的耐酸能力。

牟国翠等^[62]将栖异地克雷伯氏菌 (*Klebsiella variicola*) SHN-1 普鲁兰酶与 *K. pneumoniae*、*B. acidopullulyticus* 和 *B. naganoensis* 普鲁兰酶氨基酸序列进行同源比对,基于活性中心关键氨基酸的组成分析。确定了 8 个突变位点定点突变为酸性氨基酸。最终突变体 H852D 的最适 pH 由 5.0 降低为 4.7,且在 pH 4.5 的条件下稳定性得到提高。分析发现, H852 位点突变为 Asp 后,不但改变了活性中心的 pK_a 值,而且与周围的氨基酸多形成了 2 个新的氢键,促进结构的稳定。Wang 等^[63]构建了 *B. naganoensis* ATCC 53909 普鲁兰酶的活性氢键网络“AHBN”,选择了 2 个在 AHBN 外边缘的残基 Thr477、Asn680 进行定点突变。突变体 N680D 改变了原子电荷方向,改善了 pH 敏感性与 pH 稳定性。突变体 T477N 形成的极性氢 π 键 (Hp- π) 键,距离从 3.1 Å 缩小到 2.7 Å,影响了 His445 的 pK_a 值,提高了 pH 稳定性。最终组合突变体 N680D/T477N 进一步改善了 BNPulA324 的 pH 稳定性、pH 敏感性。Chen 等^[64]根据 *B. acidopullulyticus* 普鲁兰酶的晶体结构,基于与催化残基相连的氢键来识别可能改变 pK_a 的残基的方法,共筛选出 19 种氨基酸突变为带正电荷的 Arg。其中,突变体 L627R 的最适 pH 值从 5.0 下降到 4.0,且相对活性为野生型的 1.2 倍。Xie 等^[65]将 *P. yayanosii* CH1 II 型普鲁兰酶活性中心残基替换以及蛋白表面氨基酸突变相结合策略,获得了组合突变体 Q13H/I25E,组合突变体的最适 pH 为 5.0,与野生型相比最适 pH 从 6.4 下降到 5.0;在 pH 为 5.0 时催化效率提高了 3.3 倍;比活力提高了

2 倍为 63.9 U/mg; 在酸性 pH (pH 4.0–5.4) 条件下保持 4.0 h 后几乎保持了初始活性, 表现出更高的耐酸性。

(3) 定点突变提高普鲁兰酶的催化活力

定点突变不仅可以对普鲁兰酶进行热稳定性改造, 也被用于提高普鲁兰酶的催化活力。王馨叶^[66]使用 EVcouplings 生物信息工具将 *B. naganoensis* 普鲁兰酶 BnPul 氨基酸全序列进化耦联位点分析, 根据其耦联强度与空间分布位置理性分组残基对, 进行饱和突变, 构建得到的突变体 A232G/I226A。突变体的比活力为 550.0 U/mg, 是野生型 BnPul 活力的 1.5 倍。分析认为, 酶活力提高的原因可能是由于突变引起的远端效应对酶促反应产生影响。为了提高计算的精确度, 王馨叶将全序列缩小范围到结构域考察了结构域内与结构域间的残基对催化效率的影响, 使用 EVcouplings 分别分析 BnPul 结构域 CBM48、催化结构域和 C-末端的氨基酸序列, 并且使用 EVcomplex 分析 CBM48 和催化结构域氨基酸序列间的进化耦联位点, 根据耦联强度与空间结构位置, 选择了 7 对残基对进行饱和突变, 最终获得叠加突变体 V328L/I565L 比活力为 870.0 U/mg, 是野生型 BnPul 活力的 2.4 倍。

3.2.2 普鲁兰酶的结构域或肽段改造

普鲁兰酶一般由 5–6 个结构域组成, 其中 N 端包括 2–3 个结构域, 且多为 CBM 结构域。N 端的 CBM 结构域通常与底物结合有关, 并且与催化结构域之间的联系相对松散。普鲁兰酶的结构域或肽段改造主要集中在对 N 端 CBM 结构域或肽段的截短、替换等。

研究表明, 普鲁兰酶不稳定结构域或肽段的截短突变可以提高其热稳定性并改善酶的表达水平。这可能是由于结构域或肽段的切除使得普鲁兰酶的分子量变得更小, 结构更紧凑,

而且有利于酶的跨膜运输和正确折叠, 提高了胞外分泌效率。段绪果^[67]对 *B. deramificans* 普鲁兰酶 PulBd 的 N 端结构域或肽段 (CBM41、相关 linker 及 X25) 进行截短突变, 构建了突变体 Puld1'、Puld1 和 Puld2。结果显示, 突变体的分泌效率分别是天然酶的 3.1、3.4 和 3.8 倍, 比活力分别是天然酶的 88.1%、92.1% 和 61.8%。Pang 等^[2]根据 NCBI 保守结构域搜索分析 Pul_{PY} 结构域, 对 Pul_{PY} 的 N 端和 C 端结构域进行了截断。截短突变体 $\Delta 28N + \Delta 791C$ 的最适温度提高到 100.0 °C, 比活力为 32.2 U/mg, 是野生型 Pul_{PY} 的 6.0 倍。王馨叶^[66]采用在线工具 DisMeTa 对普鲁兰酶 BnPUL 无序结构进行预测, 并对其进行删除改造, 结果显示突变体 $\Delta N5$ 和 $\Delta N106$ 的比活力分别为 410.0 U/mg 和 490.0 U/mg, 是野生型的 1.3 倍与 1.9 倍。分析发现, $\Delta N5$ 删去了 N 端 1–5 位氨基酸无序片段, 使得酶结构更加精简与紧凑, 无规则结构含量降低, 使得酶稳定性大大提高。突变体 $\Delta N106$ 删除了 CBM41 结构域, 使得酶与底物的空间位阻变小, 有利于活性中心与底物的接触。

然而, 有些结构域的截短突变会对普鲁兰酶的折叠和活性产生不利影响。Wang 等^[68]发现 *Anoxybacillus* sp. WB42 来源的普鲁兰酶 N-末端 CBM68 结构域的缺失不仅未能提升酶的催化能力还降低了酶的热稳定性和底物选择性。张石玉^[69]对来源于甲醇芽孢杆菌 (*Bacillus methanolicus*) 的 PulPB1 的 N 端 CBM68 截短, 发现产生了大量的包涵体且其催化活性与稳定性都发生下降。段绪果^[67]对天然酶 PulBd 进行改造, 在切除了 CBM41、X25 的突变体 Puld2 基础上再次切除了 X45, 发现突变体不但没有酶活, 而且产生大量包涵体。因此, 推测上述结构域是普鲁兰酶蛋白折叠以及维持蛋白的正确构象所必需的, 该结构域的缺失极易导致包

涵体的形成和酶活性的丧失。

此外,嵌合酶策略是指通过酶工程改造的方法对蛋白质进行结构域的交换或嵌入,从而改造酶蛋白的热稳定性等特性。该策略也被用于对普鲁兰酶的改造。Li等^[70]对热小链地芽孢杆菌(*Geobacillus thermocatenulatus*)普鲁兰酶的N末端进行剪切和杂交拼接得到730T(缺失N末端85个氨基酸的PulGT)、730T-U1(730T的N末端与CBM41和X45-X25结构域拼接)和730T-U2(X45-X25域拼接的730T)。结果显示,突变体730T-U1形成大量包涵体,蛋白难以可溶表达。突变体730T-U2的 K_m 值为32.9 mg/mL,为PulGT的1.4倍。这表明N末端X45-X25结构域的插入,降低了酶的底物结合能力。此外,突变体730T和突变体730T-U2在65.0℃下的热稳定性均明显下降,表明X45-X25结构域的剪接虽然没有显著影响蛋白质表达,但对其热稳定性产生了负面影响。

4 总结与展望

普鲁兰酶能够高效水解淀粉分子中的 α -1,6-葡萄糖苷键,在淀粉深加工工业中具有重要的应用价值。近年来,随着相关行业对普鲁兰酶需求的日益增加,该酶逐渐成为食品酶学领域的研究热点之一。本文综述了普鲁兰酶产酶菌株的筛选、编码基因的鉴定及克隆表达方面的研究现状;并从宿主菌株、表达元件及发酵条件优化等方面探讨了影响普鲁兰酶产酶异源表达水平的关键因素;总结了I型、II型普鲁兰酶结构解析方面的进展,对比了不同类型普鲁兰酶在结构域组成、活性中心及关键催化残基等方面的共性及不同之处;梳理了酶分子改造技术在普鲁兰酶耐热性、耐酸性及催化活力等方面的研究进展。总结发现,普鲁兰酶研究及生产中仍然存在着酶性能不佳,以及产酶

水平低、成本高等不足,是当前及未来研究中需要解决的几个主要问题。笔者认为可以通过以下方面来进一步开展相关研究:(1)从极端环境、生物数据库等挖掘不同来源微生物中的普鲁兰酶新编码基因,以获得具有独特性能的天然普鲁兰酶;(2)近年来,在蛋白质结构的AI预测、计算机辅助酶分子设计等技术发展迅猛,这些新技术的应用为改善普鲁兰酶性能(耐热性、耐酸性等)提供了更多的技术手段和机遇;(3)此外,基于普鲁兰酶蛋白结构及序列空间相互作用的深入研究,进一步阐明影响普鲁兰酶难以可溶性表达的分子机制,并进行针对性地强化改造,有望对提升该酶可溶性表达水平起到重要作用;(4)在挖掘并改造表达元件、优化发酵体系的同时,通过宿主菌株的改造,提高宿主对重组“毒性蛋白”过量表达的耐受性,增加宿主细胞存活力、减少退化现象,进一步提高普鲁兰酶的发酵水平。

REFERENCES

- [1] Bender H, Wallenfels K. Untersuchungen an pullulan. *Biochemische Zeitschrift*, 1961, 334: 79-95.
- [2] Schülein M, Højer-Pedersen B. Characterization of a new class of thermophilic pullulanases from *Bacillus acidopullulyticus*. *Ann N Y Acad Sci*, 1984, 434: 271-274.
- [3] Huang H, Lin Y, Wang GZ, et al. Gene cloning, expression and biochemical characterization of a new multi-domain, halotolerant and SDS-resistant alkaline pullulanase from *Alkalibacterium* sp. SL3. *Process Biochem*, 2020, 96: 1-10.
- [4] Bertoldo C, Armbrecht M, Becker F, et al. Cloning, sequencing, and characterization of a heat- and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(6): 3407-3416.
- [5] 甄杰, 胡政, 李树芳, 等. 一个新型耐热普鲁兰酶的结构与功能. *生物工程学报*, 2014, 30(1): 119-128.
Zhen J, Hu Z, Li SF, et al. Structure and function of a

- novel thermostable pullulanase. *Chin J Biotech*, 2014, 30(1): 119-128 (in Chinese).
- [6] Kahar UM, Ng CL, Chan KG, et al. Characterization of a type I pullulanase from *Anoxybacillus* sp. SK3-4 reveals an unusual substrate hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6291-6307.
- [7] 陈阿娜, 刘秀霞, 戴晓峰, 等. N 端截短对嗜酸普鲁兰芽孢杆菌普鲁兰酶酶学特性及功能的影响. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 355-364.
Chen AN, Liu XX, Dai XF, et al. Effect of N-terminal truncation of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on enzyme properties and functions. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 355-364 (in Chinese).
- [8] Wei W, Ma J, Guo S, et al. A type I pullulanase of *Bacillus cereus* Nws-bc5 screening from stinky tofu brine: functional expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and enzyme characterization. *Process Biochem*, 2014, 49(11): 1893-1902.
- [9] Duan XG, Chen J, Wu J. Improving the thermostability and catalytic efficiency of *Bacillus deramificans* pullulanase by site-directed mutagenesis. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(13): 4072-4077.
- [10] Yang Y, Zhu YY, Obaroakpo JU, et al. Identification of a novel type I pullulanase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1, with high thermostability and suitable optimal pH. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 424-433.
- [11] Zhang SY, Guo ZW, Wu XL, et al. Recombinant expression and characterization of a novel cold-adapted type I pullulanase for efficient amylopectin hydrolysis. *J Biotechnol*, 2020, 313: 39-47.
- [12] 严伟, 聂尧, 徐岩. 长野芽孢杆菌 (*Bacillus naganoensis*) 普鲁兰酶在大肠杆菌中的活性表达与分泌调控. *微生物学报*, 2013, 53(2): 145-153.
Yan W, Nie Y, Xu Y. Expression and secretion regulation of *Bacillus naganoensis* pullulanase in recombinant *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(2): 145-153 (in Chinese).
- [13] Qiao Y, Peng Q, Yan J, et al. Gene cloning and enzymatic characterization of alkali-tolerant type I pullulanase from *Exiguobacterium acetylicum*. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 60(1): 52-59.
- [14] Erden-Karaoğlu F, Karakaş-Budak B, Karaoğlu M, et al. Cloning and expression of pullulanase from *Bacillus subtilis* BK07 and PY22 in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2019, 162: 83-88.
- [15] Rajaei S, Noghabi KA, Sadeghizadeh M, et al. Characterization of a pH and detergent-tolerant, cold-adapted type I pullulanase from *Exiguobacterium* sp. SH3. *Extremophiles*, 2015, 19(6): 1145-1155.
- [16] Li LM, Dong FY, Lin L, et al. Biochemical characterization of a novel thermostable type I pullulanase produced recombinantly in *Bacillus subtilis*. *Starch Stärke*, 2018, 70(5/6): 1700179.
- [17] Kar S, Ray RC, Mohapatra UB. Purification, characterization and application of thermostable amylopullulanase from *Streptomyces erumpens* MTCC 7317 under submerged fermentation. *Ann Microbiol*, 2012, 62(3): 931-937.
- [18] Rüdiger A, Jorgensen PL, Antranikian G. Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(2): 567-575.
- [19] Nisha M, Satyanarayana T. Characterization of recombinant amylopullulanase (gt-apu) and truncated amylopullulanase (gt-apuT) of the extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* NP33 and their action in starch saccharification. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(14): 6279-6292.
- [20] Pang B, Zhou L, Cui WJ, et al. A hyperthermostable type II pullulanase from a deep-sea microorganism *Pyrococcus yayanosii* CH1. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(34): 9611-9617.
- [21] Rehman HU, Siddiqui MA, Qayyum A, et al. Gene expression in *Escherichia coli* and purification of recombinant type II pullulanase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum calidifontis*. *Pak J Zool*, 2018, 50(4): 1381-1386.
- [22] Guan QT, Guo XH, Han T, et al. Cloning, purification and biochemical characterisation of an organic solvent-, detergent-, and thermo-stable amylopullulanase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Process Biochem*, 2013, 48(5/6): 878-884.
- [23] Mathupala SP, Zeikus JG. Improved purification and biochemical characterization of extracellular amylopullulanase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*

- 39E. Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39(4/5): 487-493.
- [24] Thakur M, Sharma N, Rai AK, et al. A novel cold-active type I pullulanase from a hot-spring metagenome for effective debranching and production of resistant starch. Bioresour Technol, 2021, 320(Pt A): 124288.
- [25] Meng FQ, Zhu XY, Nie T, et al. Enhanced expression of pullulanase in *Bacillus subtilis* by new strong promoters mined from transcriptome data, both alone and in combination. Front Microbiol, 2018, 9: 2635.
- [26] Zhang Y, Nie Y, Zhou X, et al. Enhancement of pullulanase production from recombinant *Bacillus subtilis* by optimization of feeding strategy and fermentation conditions. AMB Express, 2020, 10(1): 11.
- [27] Zhang K, Su LQ, Wu J. Enhanced extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* using protease-deficient strains and optimal feeding. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(12): 5089-5103.
- [28] Pang B, Zhou L, Cui WJ, et al. Production of a thermostable pullulanase in *Bacillus subtilis* by optimization of the expression elements. Starch Stärke, 2020, 72(11/12): 2000018.
- [29] 王兵波, 沈微, 钱灵紫, 等. 一种密码子优化的酸性普鲁兰酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达. 食品与发酵工业, 2016, 42(7): 9-15.
- Wang BB, Shen W, Qian LZ, et al. High expression of a codon-optimized acid-resistant pullulanase-encoding gene in *Pichia pastoris*. Food Ferment Ind, 2016, 42(7): 9-15 (in Chinese).
- [30] Zhang K, Su LQ, Wu J. Enhancing extracellular pullulanase production in *Bacillus subtilis* through *dltB* disruption and signal peptide optimization. Appl Biochem Biotechnol, 2022, 194(3): 1206-1220.
- [31] Nie Y, Yan W, Xu Y, et al. High-level expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli* with auto-induction: effect of lac operator. PLoS ONE, 2013, 8(10): e78416.
- [32] Liu X, Wang H, Wang B, et al. Efficient production of extracellular pullulanase in *Bacillus subtilis* ATCC 6051 using the host strain construction and promoter optimization expression system. Microb Cell Fact, 2018, 17(1): 163.
- [33] 杨向会, 陈晟, 吴敬. 嗜酸芽孢杆菌普鲁兰酶在大肠杆菌中的表达及发酵优化. 食品与机械, 2018, 34(5): 20-26.
- Yang XH, Chen S, Wu J. Expression of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase in *Escherichia coli* and its optimization of fermentation. Food Mach, 2018, 34(5): 20-26 (in Chinese).
- [34] Zou C, Duan XG, Wu J. Enhanced extracellular production of recombinant *Bacillus deramificans* pullulanase in *Escherichia coli* through induction mode optimization and a glycine feeding strategy. Bioresour Technol, 2014, 172: 174-179.
- [35] 杨云娟. 普鲁兰酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[D]. 昆明: 云南师范大学, 2005.
- Yang YJ. Cloning and overexpression of gene encoding the pullulanase[D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2005 (in Chinese).
- [36] Duan XG, Chen J, Wu J. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes. Bioresour Technol, 2013, 146: 379-385.
- [37] Chen AN, Li YM, Liu XX, et al. Soluble expression of pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus* in *Escherichia coli* by tightly controlling basal expression. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(12): 1803-1810.
- [38] 张磊, 唐永凯, 李红霞, 等. 促进原核表达蛋白可溶性的研究进展. 中国生物工程杂志, 2021, 41(S1): 138-149.
- Zhang L, Tang YK, Li HX, et al. Advances in promoting solubility of prokaryotic expressed proteins. China Biotechnol, 2021, 41(S1): 138-149 (in Chinese).
- [39] Carneiro S, Ferreira EC, Rocha I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. J Biotechnol, 2013, 164(3): 396-408.
- [40] Chen WB, Nie Y, Mu XQ, et al. Auto-induction-based rapid evaluation of extracellular enzyme expression from lac operator-involved recombinant *Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174(7): 2516-2526.
- [41] 安展飞, 栗亚美, 杨艳坤, 等. 过表达人工设计的sRNA(anti-micA)提高大肠杆菌存活力和普鲁兰酶产量. 生物学杂志, 2017, 34(1): 16-22.
- An ZF, Li YM, Yang YK, et al. Overexpression of artificial sRNA anti-micA enhancing *Escherichia coli* viability and pullulanase production. J Biol, 2017,

- 34(1): 16-22 (in Chinese).
- [42] Xu P, Zhang SY, Luo ZG, et al. Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(3): 43.
- [43] Hernandez-Garcia CM, Finer JJ. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Sci*, 2014, 217/218: 109-119.
- [44] Song W, Nie Y, Mu XQ, et al. Enhancement of extracellular expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis*: effects of promoter and host. *Protein Expr Purif*, 2016, 124: 23-31.
- [45] Wang YP, Liu YH, Wang ZX, et al. Influence of promoter and signal peptide on the expression of pullulanase in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(9): 1783-1789.
- [46] Wang XY, Chen YQ, Nie Y, et al. Improvement of extracellular secretion efficiency of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli*: peptide fusion and cell wall modification. *Protein Expr Purif*, 2019, 155: 72-77.
- [47] Deng Y, Nie Y, Zhang Y, et al. Improved inducible expression of *Bacillus naganoensis* pullulanase from recombinant *Bacillus subtilis* by enhancer regulation. *Protein Expr Purif*, 2018, 148: 9-15.
- [48] Li T, Ding YT, Zhang J, et al. Improving the expression of recombinant pullulanase by increasing mRNA stability in *Escherichia coli*. *Electron J Biotechnol*, 2017, 29: 63-67.
- [49] Kleiner-Grote GRM, Risse JM, Friehs K. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Eng Life Sci*, 2018, 18(8): 532-550.
- [50] Duan XG, Zou C, Wu J. Triton X-100 enhances the solubility and secretion ratio of aggregation-prone pullulanase produced in *Escherichia coli*. *Bioresour Technol*, 2015, 194: 137-143.
- [51] Yang HQ, Qu JF, Zou W, et al. An overview and future prospects of recombinant protein production in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2021, 105(18): 6607-6626.
- [52] Zou C, Duan XG, Wu J. Efficient extracellular expression of *Bacillus deramificans* pullulanase in *Brevibacillus choshinensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(4): 495-504.
- [53] Zou C, Duan XG, Wu J. Magnesium ions increase the activity of *Bacillus deramificans* pullulanase expressed by *Brevibacillus choshinensis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(16): 7115-7123.
- [54] Turkenburg JP, Brzozowski AM, Svendsen A, et al. Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Proteins*, 2009, 76(2): 516-519.
- [55] Xu JY, Ren FF, Huang CH, et al. Functional and structural studies of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. LM18-11. *Proteins Struct Funct Bioinform*, 2014, 82(9): 1685-1693.
- [56] Saka N, Malle D, Iwamoto H, et al. Relationship between the induced-fit loop and the activity of *Klebsiella pneumoniae* pullulanase. *Acta Crystallogr Sect D*, 2019, 75(9): 792-803.
- [57] Hondoh H, Kuriki T, Matsuura Y. Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothersophilus* neopullulanase. *J Mol Biol*, 2003, 326(1): 177-188.
- [58] Cockburn DW, Kibler R, Brown HA, et al. Structure and substrate recognition by the *Ruminococcus bromii* amylosome pullulanases. *J Struct Biol*, 2021, 213(3): 107765.
- [59] Bi JH, Chen SH, Zhao XH, et al. Computation-aided engineering of starch-debranching pullulanase from *Bacillus thermoleovorans* for enhanced thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(17): 7551-7562.
- [60] Chang MH, Chu XY, Lv JZ, et al. Improving the thermostability of acidic pullulanase from *Bacillus naganoensis* by rational design. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0165006.
- [61] Pang B, Zhou L, Cui WJ, et al. Improvement of the thermostability and activity of pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191(3): 942-954.
- [62] 牟国翠, 聂尧, 穆晓清, 等. 定点突变提高克雷伯氏菌普鲁兰酶的耐酸性. *食品与生物技术学报*, 2016, 35(12): 1247-1252.
- Mu GC, Nie Y, Mu XQ, et al. Site-directed mutagenesis of *Klebsiella variicola* pullulanase for the improvement of its acid resistance. *J Food Sci Biotechnol*, 2016, 35(12): 1247-1252 (in Chinese).
- [63] Wang QY, Xie NZ, Du QS, et al. Active hydrogen bond

- network (AHBN) and applications for improvement of thermal stability and pH-sensitivity of pullulanase from *Bacillus naganoensis*. PLoS One, 2017, 12(1): e0169080.
- [64] Chen AN, Xu TT, Ge Y, et al. Hydrogen-bond-based protein engineering for the acidic adaptation of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase. Enzyme Microb Technol, 2019, 124: 79-83.
- [65] Xie T, Zhou L, Han LC, et al. Modulating the pH profile of the pullulanase from *Pyrococcus yayanosii* CH1 by synergistically engineering the active center and surface. Int J Biol Macromol, 2022, 216: 132-139.
- [66] 王馨叶. 普鲁兰酶催化效率强化的分子改造及其分泌表达调控[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- Wang XY. Molecular engineering of pullulanase for enhancement of catalytic efficiency and its extracellular expression regulation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [67] 段绪果. 淀粉脱支酶的重组表达及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- Duan XG. Overexpression and molecular modification of starch debranching enzymes[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013 (in Chinese).
- [68] Wang JF, Liu ZM, Zhou ZM. The N-terminal domain of the pullulanase from *Anoxybacillus* sp. WB42 modulates enzyme specificity and thermostability. Chembiochem, 2018, 19(9): 949-955.
- [69] 张石玉. 来源于甲醇芽孢杆菌的普鲁兰酶的重组表达、酶学性质及分子改造研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- Zhang SY. A novel type I pullulanase from *Bacillus methanolicus* Pb1: recombinant expression, characterization and molecular modification[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [70] Li LM, Dong FY, Lin L, et al. N-terminal domain truncation and domain insertion-based engineering of a novel thermostable type I pullulanase from *Geobacillus thermocatenulatus*. J Agric Food Chem, 2018, 66(41): 10788-10798.

(本文责编 陈宏宇)