

纤维素降解菌中葡聚糖酶基因的克隆表达及活性

宁玉洁, 闯绍闯, 陈晓琳*, 粟冠和郎*, 王道胜, 常艳, 唐欣昀

(安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036)

摘要: 为探明约氏梭菌(*Clostridium josui*)中纤维小体内某个酶的功能性, 从该菌属 CJ-1 菌株中克隆出基因片段 *Cel9C*, 大小为 1943 bp, 编码 647 个氨基酸, 将该基因构建于大肠杆菌表达载体 pET28a(+)中, 获得重组表达载体 pET28a-Cel9C, 转化至大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中进行表达。结果表明, 该酶的最适反应温度为 45℃, 最适反应 pH 为 pH6.0; 对大麦-β-葡聚糖 (Barley-β-glucan) 和魔芋葡甘聚糖 (Konjac glucomannan) 具有较高的反应活性, 比活值分别达到 114 和 57 U·mg⁻¹; 几乎不能以木聚糖 (Brichwood xylan) 和半乳甘露寡糖 (Galacto mannan) 为底物。说明该酶对葡聚糖类物质时有较高的降解能力, 应为葡聚糖酶。

关键词: 约氏梭菌; 葡聚糖酶; 克隆; 表达; 酶活

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)06-0910-05

Expression of a glucanase gene *cel9C* from *Clostridium josui* and the activity of its recombinant enzyme

NING Yujie, CHUANG Shaochuang, CHEN Xiaolin, Kazuo Sakka,

WANG Daosheng, CHANG Yan, TANG Xinyun

(School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: With the purpose of detecting enzyme property of cellulosome in *Clostridium josui*, *cel9C* from *Clostridium josui* CJ-1 was cloned into the vector pET28a to construct the recombinant plasmid pET28a-Cel9C which was further transformed into *E. coli* strain BL21 (DE3). The results showed that the *Cel9C* gene (1943 bp with 647 amino acids) was effectively expressed in *E. coli*. The optimum condition of the enzyme was 45°C and pH 6.0. The enzyme showed a strong activity towards Barley-β-glucan (114 U/mg) and Konjac glucomannan (57 U/mg), while it showed an extremely low activity towards brichwood xylan and galacto mannan, suggesting that this enzyme should be a kind of glucanase.

Key words: *Clostridium josui*; glucanase; gene clone; expression; enzyme activity

纤维素等多聚物是自然界大量存在的可再生资源, 其资源化利用已成为当今世界研究的热点。利用微生物产生的纤维素酶可将纤维素转化为还原糖, 再通过发酵可产生乙醇、丙酮、丁醇等有机化工原料或燃料, 甚至可以转变为饲料、食物和药物, 这些对于解决能源危机、粮食短缺、环境污染等问题都有重大的意义^[1]。纤维素酶不是单种酶, 而是所有参与纤维素降解过程并最终获得葡萄糖等单糖、寡糖的各种酶的总称, 是一类起协同作用的多组分酶系。不同酶系通常会有多个在结构、功能和

活性上不同的组分, 每一组分又可能由不同的亚组分组成, 构成了纤维素酶的多型性^[2]。约氏梭菌 (*Clostridium josui*) 中纤维素酶的复合体被称为纤维小体, 是一个包含 11 个降解纤维素酶和具有多种功能的超分子结构, 11 个酶分别由 *cipA*, *cel48A*, *cel8A*, *cel9A*, *cel9B*, *orfX*, *cel9C*, *cel9D*, *man5A*, *cel9E* 和 *cel5B* 编码, 在这些酶的共同作用下形成该菌株完整的水解纤维素的活性。国内外学者均在尝试利用基因工程技术探究各纤维小体的组分构成及其功能。本实验克隆 *C.josui* 中 *cel9C* 基因, 构建出可以

收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目 (KJ2009A107) 资助。

作者简介: 宁玉洁, 硕士。E-mail: Jennifer0630@126.com

* 通信作者: 陈晓琳, 副教授。E-mail: cxlzyx@ahau.edu.cn 粟冠和郎, 教授, 博士生导师。E-mail: sakka@bio.mie-u.ac.jp

降解纤维素的基因工程菌, 在对其表达产物功能和特性的研究后, 初步认定该酶是具有较高活性和专一性的葡聚糖酶, 既完善了对约氏梭菌中纤维小体的组分研究, 也为葡聚糖酶在工业生产中的广泛应用提供实验依据^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 约氏梭菌 (*Clostridium josui*) CJ-1 菌株, 由本实验室分离保存; *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 菌株和质粒 pET28a (+) 均有本实验室保存。

1.1.2 酶与试剂 *Bam*H I、*Sal* I 酶、PCR 试剂、DNA 连接试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 Takara 公司, 其他生化试剂均为分析纯。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GeneBank 上发表的纤维素降解基因中 *cel9C* 序列设计 1 对引物。

上游引物 Cel9C-Fd:

5'-GGGGGATCCACAACCGCTTTTAACTATGG-3';

下游引物 Cel9C-Rv:

5'-GGGGTTCGACTCAAATTATCGGTGGTTCTTCAC-3'

两引物中分别含有 *Bam*H I、*Sal* I 的酶切位点, 由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 梭菌属 (*C. josui*) 菌株全基因组 DNA 的提取 采用 SDS 蛋白酶 K 法提取基因组 DNA^[4]。

1.2.2 目的基因的扩增 以基因组 DNA 为模板用引物 Cel9C-Fd 和 Cel9C-Rv 进行 PCR 扩增, 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.3 重组质粒的构建 将 PCR 产物与质粒 pET28a(+) 同时进行 *Bam*H I、*Sal* I 的双酶切反应, 所得产物电泳检测后回收, 加入 Ligation Kit I (DNA 连接酶) 16 $^{\circ}$ C 反应 3 h, 构建重组质粒 pET28a-Cel9C, 上述载体转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中, 利用含有卡那霉素(Km)的 LB 平板筛选重组转化子。

1.2.4 重组质粒的双酶切验证与序列分析 提取上述转化子中的质粒, 经过 *Bam*H I、*Sal* I 的双酶切作用后, 酶切产物在 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

转化子中提取的质粒交由上海生工进行测序, 所得结果与 GeneBank 上的 *cel9C* 基因进行序列同源性分析。

1.2.5 IPTG 诱导阳性转化子分泌表达 将重组质粒 pET28a-Cel9C 转化至表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 中, 涂布于含有 50 μ g \cdot mL⁻¹ Km 的 LB 平板上, 筛选

阳性转化子。挑取转化子至含 50 μ g \cdot mL⁻¹ Km 和 1 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 的 LB 培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 待长出菌落后再覆盖一层 0.5% 的 CMC 固体培养基, 45 $^{\circ}$ C 过夜培养, 用 1% 的刚果红溶液染色 20 min, 1 mol \cdot L⁻¹ NaCl 溶液洗涤, 观察水解圈大小。

1.2.6 纤维素酶的纯化及 SDS-PAGE 电泳检测 阳性转化子在超级培养基中 37 $^{\circ}$ C 摇瓶培养 3 h, $D_{600\text{nm}}$ 值达到约 0.6 时加入 IPTG 进行诱导, 继续摇瓶培养 3~4 h 后离心收集菌体, 超声波破碎仪处理菌体沉淀后再次离心, 保留含有粗蛋白的上清液。载体 pET28a 本身携带有 His-tag, 可以通过镍柱流穿的方法纯化得到目的蛋白, 收集液经 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.7 纤维素酶浓度的测定 以牛血清蛋白(BSA)作标准曲线, Dye Regent Concentrate 方法^[5]测定纤维素酶浓度。

1.2.8 纤维素酶的特性研究 根据 DNS^[6] 及 Somogyi-Nelson^[7] 法测定反应产生还原糖浓度的原理, 利用酶解产物还原糖浓度来研究纤维素酶的最适反应条件以及温度和 pH 耐受性^[8]。

1.2.9 纤维素酶的定性检测 利用硅胶薄层层析法 (TLC) 确定纤维素酶的作用位点和专一性^[9]。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建与验证

采用 PCR 方法从约氏梭菌菌株总 DNA 中扩增出 *cel9C* 基因片段, 连接到载体 pET28a(+) 上, 构成新的重组质粒 pET28a-Cel9C。对重组质粒和 PCR 产物进行 *Bam*H I、*Sal* I 的双酶切验证, 结果证明目的基因已成功插入载体中, 证明重组质粒构建成功。

对重组质粒中 PCR 产物进行测序后, 与 GeneBank 中的 *cel9C* 基因进行同源性分析。得到结果是, 测序基因与 *cel9C* 为同一基因, 大小为 1943 bp, 共编码 647 个氨基酸。

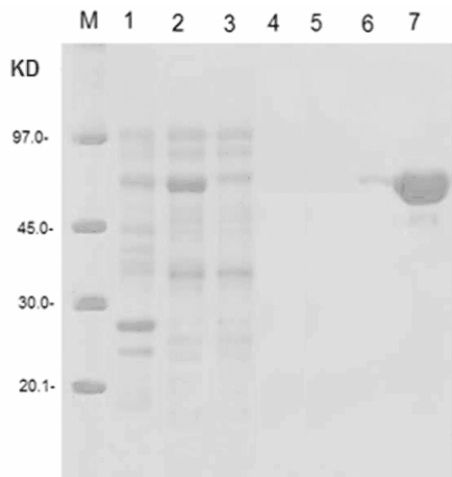
2.2 目的基因在大肠杆菌中的表达及分析鉴定

根据 1.2.6 中的方法将含有目标蛋白的上清液流经镍柱而被吸附, 再用不同浓度的咪唑洗脱液 (30、60、100 和 300 mmol \cdot L⁻¹) 洗脱镍柱, 得到的收集液经 SDS-PAGE 电泳 (图 1)。由图可知, 7 号泳道中在 73 kD 处有一条明显条带, 表达蛋白分子量与理论值一致, 证明 300 mmol \cdot L⁻¹ 的咪唑收集液中含有大量的目的蛋白。

按照 1.2.5 中的实验方法, 含有重组质粒的大肠杆菌在 LB-CMC 平板上的分泌表达结果如图 2 所示。菌落周围有一圈明显的透明水解圈, 说明目的

基因在大肠杆菌内分泌表达,且表达的纤维素酶具有水解纤维素的能力。

根据不同浓度的牛血清蛋白(BSA)作出标准曲线,采用Dye Regent Concentrate方法测出目的蛋白在 D_{595nm} 处吸光值,利用标准曲线算出蛋白浓度为 $2.91\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。



1. 不可溶蛋白 Insoluble protein; 2. 可溶蛋白 Soluble protein; 3. 流穿蛋白 Flow protein; 4. $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱蛋白 Protein elution with imidazole; 5. $60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 6. $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 7. $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

图1 纤维素酶 SDS-PAGE 电泳

Figure 1 SDS-PAGE of the target protein



图2 纤维素酶在LB-CMC平板上的表达

Figure 2 The expression of Cel9C on LB-CMC plate

2.3 纤维素酶的特性研究

2.3.1 温度、pH对酶活及其稳定性的影响^[10] 在不同温度条件下测定该纤维素酶酶活,以温度为横坐标,以不同温度下的酶活与最适温度(45°C)下酶活的百分比值(相对酶活)为纵坐标,所得结果如图3(菱形)。结果表明,纤维素酶酶活随温度升高而升高,在 45°C 时酶反应速度最快,酶活达到最高,但随着温度继续升高,酶反应速度下降;将纤维素

酶在反应前分别置于 $30^{\circ}\text{C}\sim 80^{\circ}\text{C}$ 的条件下保温1h,检测纤维素酶的残余酶活。以温度为横坐标,以不同温度下的残余酶活与上述反应中最适温度(45°C)下酶活的百分比值(相对残余酶活)为纵坐标,所得结果如图3。结果表明,纤维素酶在 $30^{\circ}\text{C}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 的条件下具有较高的稳定性,酶活都在70%以上,随着温度的上升,酶的稳定性剧烈下降。

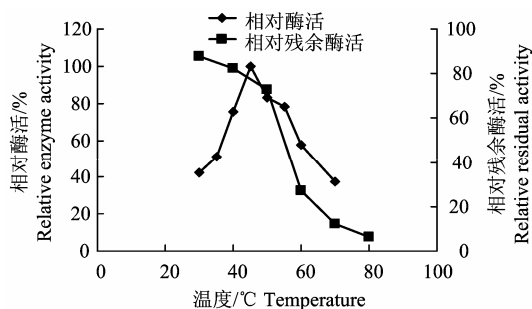


图3 温度对酶活及稳定性的影响

Figure 3 Effects of temperature on enzyme activity and stability

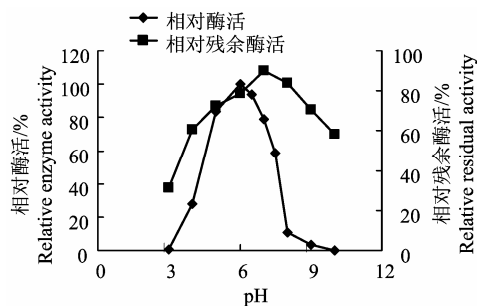


图4 pH对酶活及稳定性的影响

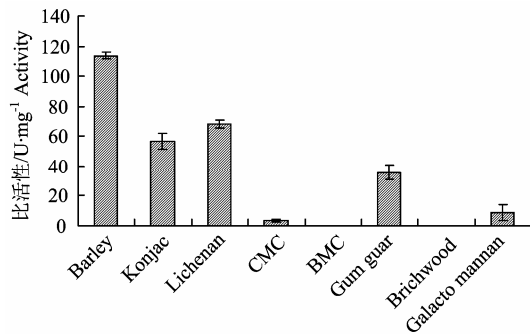
Figure 4 Effects of pH on enzyme activity and stability

在不同pH条件下测定该纤维素酶酶活,以pH为横坐标,以不同pH条件下酶活与最适pH值(pH 6.0)条件下酶活的百分比值(相对酶活)为纵坐标,所得结果如图4(菱形)。结果表明,纤维素酶在pH 6.0时酶活达到最高,pH值过高或过低都会对酶活造成不利的影响;将纤维素酶在反应前分别置于pH 3.0~pH 10.0的条件下 4°C 保温16h,检测纤维素酶的残余酶活。以pH为横坐标,以不同pH条件下的残余酶活与上述反应中最适pH值(pH 6.0)下酶活的百分比值(相对残余酶活)为纵坐标,所得结果如图4(正方形)。结果表明,纤维素酶在pH 5.0~9.0的条件下具有较高的稳定性,酶活都在70%以上,pH值过高或过低都会破坏酶的稳定性^[11-12]。

2.3.2 纤维素酶对不同反应底物的活性研究

*C.josui*菌株内的纤维小体内含有多种酶,在它们的共同作用下才形成了该菌株降解纤维素的特性,它们中可能包含纤维素酶,葡聚糖酶,甘露糖

酶, β -1,4-纤维素内切酶, β -葡萄糖苷酶等。利用 Somogyi-Nelson 法检测纤维素酶对 8 种底物: 大麦- β -葡聚糖 (Barley- β -glucan), 魔芋葡甘露聚糖 (Konjac glucomannan), 地衣淀粉 (Lichenan), 木聚糖 (Brichwood xylan), 瓜儿胶 (Guar gum), 羧甲基纤维素钠 (CMC), 半乳甘露寡糖 (Galactomannan), 球状纤维素 (BMC) 的降解能力^[15]。由图 5 可看出, 相较于以木聚糖和半乳甘露寡糖, 该酶对大麦- β -葡聚糖和魔芋葡甘露聚糖具有超高的降解能力, 比活值分别达到了 114 和 57 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 推测该酶应为葡聚糖酶。



1.Konjac(-); 2. Konjac(+); 3. Marker of Konjac; 4.Barley (-) ; 5.Barley (+) ; 6. Marker of barley

图 5 纤维素酶对各底物的比活值

Figure 5 The specific activity towards different substrates

2.3.3 纤维素酶的薄层层析定性检测 分别取以魔芋葡甘露聚糖和大麦- β -葡聚糖为底物反应 16 h 的酶解液进行硅胶板薄层层析检测。图 6 中, 1 号和 4 号分别为不加酶反应的对照组, 3 号和 6 号分别为魔芋。

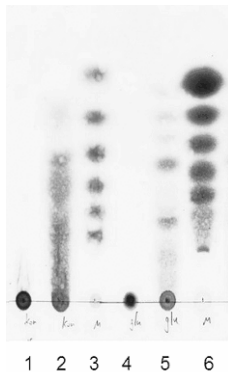


图 6 水解产物的的 TLC 分析

Figure 6 TLC of hydrolysis products

葡甘露聚糖和大麦- β -葡聚糖水解脱产物的 Marker; 2 号为魔芋葡甘露聚糖酶解 16 h 产物的展层效果图, 有明显的拖尾现象, 并没有出现清晰的

单糖斑点, 说明单糖没有被分离完全, 魔芋葡甘露聚糖由甘露糖及葡萄糖聚合而成, 该酶只能水解其中的葡聚糖组分, 甘露多聚糖仍然大量残留于酶解液中而造成了拖尾; 5 号为大麦- β -葡聚糖酶解 16 h 产物的展层效果图, 图中斑点清晰几乎无拖尾现象, 说明聚合度大的多糖已被分解为单糖和低聚糖。根据该酶的专一性可以确定其为葡聚糖酶。

3 讨论

自然界中存在着大量难以降解的葡聚糖及葡聚糖复合物, 例如魔芋的主要成分魔芋葡甘露聚糖是一种水溶性的膳食纤维, 具有净化血液、降低血糖等功效^[16]。但魔芋本身有毒, 须经磨粉、蒸煮、漂洗等过程脱毒, 在加工成食品的过程中可以利用葡聚糖酶水解魔芋胶, 得到的产物甘露聚糖既安全无毒又保持了魔芋原有的保健功效。啤酒酿造工业中原料大麦含有 5%~10% 的 β -葡聚糖, 大麦在发芽过程中葡聚糖分解不完全, 最终造成麦汁过滤困难及啤酒的非生物性浑浊等负面影响, 研究证明在啤酒酿造过程中添加葡聚糖酶, 既增加了原料的收得率也提高了啤酒质量^[17]。蔗糖在制备过程中会部分形成葡聚糖, 加入葡聚糖酶可提高产率减少经济损失。在饲料中添加葡聚糖酶则可降低消化道内容物黏度, 有效地改善单胃动物对营养物质的消化吸收, 提高饲料转化率^[18]。

本实验采用基因工程的方法, 使葡聚糖酶基因在大肠杆菌中成功获得表达, 构建出单一、高效产葡聚糖酶的工程菌株, 该酶对大麦- β -葡聚糖的水解活性为 114 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 对魔芋葡甘露聚糖的水解活性为 57 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 高于热纤梭菌内切 β -1,4-葡聚糖酶的酶活^[19]。它的最适反应温度为 45 $^{\circ}\text{C}$, 具有良好的耐热性, 属于兼性嗜热菌, 适于投入工业生产使用。葡聚糖酶作为一种新型添加剂, 具有良好的社会效益和经济效益, 在食品、酿造、饲料、日化等工业方面的应用价值正逐步凸显出来, 开发前景十分广阔, 构建出活力更高、稳定性更强、适于生产使用的工程菌株是目前研究发展的方向。

参考文献:

- [1] 谷嵩, 刘昱辉. 纤维素酶的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(25): 7736-7737.
- [2] 孟雷, 陈冠军, 王怡, 等. 纤维素酶的多型性[J]. 纤维素科学与技术, 2002, 10(2): 47-55.
- [3] Sakka M, Goto M, Fujii T, et al. Analysis of a *Clostridium josui* cellulase gene cluster containing the man5A gene and characterization of recombinant Man5A Bioscience[J]. Biotechnology, and Biochemistry, 2010, 74(10): 2077-

- 2082.
- [4] 康传红, 韩晓云, 关卫夫, 等. 甜菜基因组 DNA 三种提取方法的对比研究[J]. 中国糖料, 2002, 2(1): 1-4.
- [5] 李海玲, 彭书明, 李凇, 等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(4): 277-282.
- [6] 赵凯, 许鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- [7] Nelson N.A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose[J]. J Biol Chem, 1944, 153(2): 375-380.
- [8] Bischoff K M, Rooney A P, Li X L, et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(21): 1761-1765.
- [9] 颜军, 郭晓强, 李晓光, 等. TLC 快速分析多糖的单糖组成[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 603-607.
- [10] Sakka M, Higashi Y, Kimura T, et al. Characterization of *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 Xyn10D, a xylanase that contains a family 3 carbohydrate-binding module[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77 (12): 4260-4263.
- [11] 吴琪, 谢红云, 段垒, 等. β -葡聚糖酶的酶学性质研究[J]. 饲料研究, 2010(2): 34-37.
- [12] 张秀艳, 何国庆. 微生物源 β -葡聚糖酶的稳定性研究[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2007, 33(3): 387-391.
- [13] 齐军茹, 廖劲松. β -甘露聚糖酶的制备及其应用研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 12-15.
- [14] 营红磊, 张卫明, 蒋建新, 等. 半乳甘露聚糖胶酶法改性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2): 5-10.
- [15] Fujii T, Fang X, Inoue H, et al. Enzymatic hydrolyzing performance of *Acremonium cellulolyticus* and *Trichoderma reesei* against three lignocellulosic materials[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2(1): 24.
- [16] 李剑芳, 郭敏辰, 程科, 等. β -甘露聚糖酶制备魔芋葡甘露低聚糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(1): 21-24.
- [17] 宫春波, 谢丽源. β -葡聚糖酶及在啤酒工业中的应用[J]. 广州食品工业科技, 2002, 18(1): 58-59.
- [18] 邹东恢, 江洁. β -葡聚糖酶的开发与应用研究[J]. 农产品加工学刊, 2005(8): 7-9.
- [19] 常巧玲. 热纤梭菌 β -1,4-内切葡聚糖酶基因 *celD* 在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.