

# 纤维素酶 EGA 基因在枯草芽孢杆菌中的表达及其产物性质研究

张漫莉, 耿新伟, 王梦婷, 蒋磊, 赵辅昆, 陈玮

(浙江理工大学蛋白质组学与分子酶学实验室, 杭州 310018)

**摘要:** 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 是一种高效的外源蛋白表达菌株, 能将目的蛋白分泌到细胞外的培养基中。从福寿螺胃液共生菌株 *Bacillus* sp. Strain AC-1 基因组中克隆纤维素酶 EGA 的基因序列, 利用基因工程技术构建纤维素酶 EGA 的重组枯草芽孢杆菌表达载体 pAUsp-ega。该载体含有一个强启动子和一段信号肽, 经淀粉诱导能表达外源蛋白。以枯草芽孢杆菌蛋白酶缺失型菌株 WB700 为宿主菌, 表达得到的重组纤维素酶 EGA 以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物得到的培养基上清酶活力达到 1 120 U/L。该纤维素酶在 pH 6.0 表现最大水解活力, 最适反应温度为 60℃, 在酸性条件下稳定性良好, 具有较好的应用前景。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 纤维素酶 EGA; 分泌; 羧甲基纤维素钠

**中图分类号:** Q786

**文献标志码:** A

## 0 引言

纤维素是自然界中分布广泛的可再生资源, 如农业废弃物(稻草、秸秆、甘蔗渣等)、食品加工废弃物(果皮、果渣等)、木材废弃物(木屑、树皮等)及城市废弃物(废纸)等都是纤维素的丰富来源。地球上每年光合作用可产生大于 100 亿吨的植物干物质, 其中一半以上是纤维素和半纤维素<sup>[1-3]</sup>。纤维素是植物干物质中细胞壁的主要成分, 约占植物干重的 35%~50%<sup>[4]</sup>。如果能有效地利用生物技术将纤维素物质转化成简单糖, 继而再发酵生产乙醇等生物能源物质, 将对解决能源危机、环境污染等一系列问题有重要意义<sup>[5]</sup>。

纤维素酶(cellulase)是一类能将纤维素水解成纤维二糖和葡萄糖等简单糖的多种酶组成的复合酶体系, 包括内切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(endo-1,4- $\beta$ -glucanase, EC3.2.1.4)、外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(exo-1,4- $\beta$ -glucanase, EC3.2.1.91)和  $\beta$ -1,4-糖苷酶( $\beta$ -1,4-glucosidase, EC3.2.1.21)<sup>[6-8]</sup>。内切  $\beta$ -1,4-葡聚

糖酶随机作用于纤维多糖内部无定形区, 产生大量的寡糖和新末端。外切  $\beta$ -1,4-葡聚糖酶作用于这些还原性或非还原性的末端, 产生纤维二糖,  $\beta$ -1,4-糖苷酶将纤维二糖分解成两分子的葡萄糖<sup>[9]</sup>。纤维素酶 EGA 是由福寿螺胃液中分离出的共生菌株 *Bacillus* sp. Strain AC-1 所产的一种纤维素内切酶。编码该酶的基因含有 1 980 bp 的开放阅读框, 编码 659 个氨基酸残基<sup>[10]</sup>。该酶具有较好的热稳定性且在酸性条件下相对稳定, 有较好的工业应用前景。

枯草芽孢杆菌是一类好氧型、内生抗逆孢子的典型的革兰氏阳性杆状细菌, 可作为基因工程表达的宿主菌。与大肠杆菌等表达系统相比, 枯草芽孢杆菌具有蛋白分泌能力强<sup>[11]</sup>、遗传背景清晰<sup>[12]</sup>和不含内毒素<sup>[13-14]</sup>等优点。

本文从 *Bacillus* sp. Strain AC-1 基因组中克隆得到纤维素酶 EGA 的基因 *ega*, 并在枯草芽孢杆菌中开展表达重组纤维素酶 EGA 的研究及重组酶的性质分析。

收稿日期: 2012-11-06

基金项目: 浙江省大学生科技成果推广项目(2011R406051)

作者简介: 张漫莉(1989-), 女, 安徽阜阳人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和发酵工艺的研究。

通信作者: 陈玮, 电子邮箱: cw@zstu.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

KOD-Plus-Neo DNA polymerase 购自 TOYOBO 公司; Taq DNA polymerase、胶回收试剂盒购自上海天根生物工程有限公司; 限制性内切酶、 $T_4$  DNA 连接酶、PCR 产物回收试剂盒均购自 Takara 公司; 质粒抽提试剂盒购自上海博大泰克生物技术有限公司。

其余试剂为国产试剂分析纯。

### 1.2 EGA 基因的克隆

用细菌基因组抽提试剂盒抽提 *Bacillus* sp. Strain AC-1 基因组 DNA 作为 PCR 反应的模板, 用特异性引物 SPEGA1 *Nhe* I / EGAMC2 *Eco*R I 克隆得到纤维素酶 EGA 的基因序列。SPEGA1 *Nhe* I 和 EGAMC2 *Eco*R I 序列见表 1, PCR 反应体系见表 2。扩增产物用 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

表 1 PCR 反应引物

SPEGA1 <i>Nhe</i> I	TTCGCTAGCGCAATGTCAGAT-TACAACATATG
EGAMC2 <i>Eco</i> R I	ACGAATTCTTACTTGTTCG-GAAGTGTTCCAAACA

注: 下划线表示酶切位点。

表 2 PCR 反应体系

体系	50 $\mu$ L
模板: <i>Bacillus</i> sp. strain AC-1 基因组	1 $\mu$ L
上游引物: SPEGA1 <i>Nhe</i> I	1 $\mu$ L
下游引物: EGAMC2 <i>Eco</i> R I	1 $\mu$ L
DNA 合成酶: KOD-plus-neo DNA polymerase	1 $\mu$ L
10 $\times$ KOD-plus-neo buffer	5 $\mu$ L
dNTPs(2 mM)	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	36 $\mu$ L

在上述的反应体系下进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 预变性: 94 $^{\circ}$ C, 2 min; 变性: 98 $^{\circ}$ C, 10 s; 退火: 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 68 $^{\circ}$ C, 2 min。

### 1.3 表达载体的构建

pAsp 质粒含有来源于淀粉酶的强启动子 Pam-yQ 和果胶酶 Pel-4 信号肽序列, PCR 扩增得到的目的基因片段和 pAsp 载体分别用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切消化处理。酶切产物回收后, 用  $T_4$  DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌感受态菌株 DH5 $\alpha$ , 用 Amp(50  $\mu$ g/mL) 抗性平板筛选阳性克隆。转化菌体的质粒经过 PCR 和双酶切鉴定以后测序, 测序正确的质粒命名为 pAsp-ega。

pAsp-ega 质粒和来源于芽孢杆菌 pUB110 质

粒分别用 *Bam*H I 单酶切消化处理, 线性化的 pUB110 质粒与 pAsp-ega 质粒连接后转化大肠杆菌感受态菌株 DH5 $\alpha$ , 用 Amp(50  $\mu$ g/mL) 抗性平板筛选。得到的阳性重组载体命名为 pAsp-ega-pUB110, 即得到既可以在枯草芽孢杆菌中又可以在大肠杆菌中扩增的穿梭质粒。

为了提高载体的扩增效率, 用 *Eco*R I 单酶切消化处理除去穿梭载体 pAsp-ega-pUB110 上原位于 pAsp 质粒上的大肠杆菌来源的复制起始点等元件后, 回收 DNA 片段, 加入  $T_4$  DNA 连接酶使含有枯草表达原件的线性载体片段自连接, 连接产物转化感受态枯草芽孢杆菌蛋白酶缺失菌株 WB700, 用 Kan(50  $\mu$ g/mL) 抗性平板筛选, 得到的阳性菌株即含有重组表达载体 pAUsp-ega 的菌株。

### 1.4 EGA 基因的表达及酶活力分析

从转化得到的 Kan(50  $\mu$ g/mL) 抗性平板上挑取 pAUsp-ega/WB700 单克隆, 接种到 3 mL 新鲜的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 12 h 后, 按照 1:100 的比例转接到枯草芽孢杆菌表达培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 培养 24 h。菌液经 5 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min 后, 收集上清液。

酶活力测定方法:

取 180  $\mu$ L 质量体积比为 1% 的 CMC-Na(溶于 20 mM pH 6.5 的磷酸钠缓冲液中)于 65 $^{\circ}$ C 水浴预热 10 min, 加入 20  $\mu$ L 酶液, 65 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min, 加入 0.5 mL DNS 试剂终止反应, 沸水浴 5 min 后, 立即冷水浴冷却, 补加 0.5 mL 双蒸馏水, 用可见分光光度计读取 520 nm 吸光度值。灭活的酶液在同样条件下反应作为空白对照。酶活定义为: 在上述条件下, 1 min 水解生成 1  $\mu$ mol 还原糖当量所需要的酶量为一个活力单位。

### 1.5 纤维素酶 EGA 的性质分析

#### 1.5.1 pH 对纤维素酶 EGA 的活性以及稳定性的影响

配制不同 pH 值 (pH 3~9) 的 Britton-Robinson 缓冲溶液, 在不同 pH 的缓冲液体系中, 65 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min, 测定纤维素酶 EGA 的最适反应 pH。通过表达培养基上清在不同 pH 缓冲液 (pH 3~9) 中 37 $^{\circ}$ C 保温 3 h 后, 65 $^{\circ}$ C 水浴反应 10 min, 测定纤维素酶 EGA 的残余活力来分析纤维素酶 EGA 的 pH 稳定性。

#### 1.5.2 温度对纤维素酶 EGA 的活性以及稳定性的影响

在 pH 6.0 的 Britton-Robinson 缓冲溶液中, 于 40~80 $^{\circ}$ C 范围内, 水浴反应 10 min, 测定纤维素酶 EGA 的最适反应温度。表达培养基上清分别在在相

应的 40~80℃ 温度下保温 0.5、1、1.5、2 h 后,65℃ 水浴反应 10 min,测定纤维素酶 EGA 的残余活力来分析酶的温度稳定性。

## 2 结果

### 2.1 *ega* 基因的克隆和重组表达载体的构建

通过基因重组技术成功构建了表达纤维素酶 EGA 的重组芽孢杆菌 pAUsp-*ega*/WB700。重组表达质粒 pAUsp-*ega* 经 PCR 鉴定为阳性(引物: SPEGA *Nhe* I, EGAMC2 *Eco*R I),基因 *ega* 经测序鉴定成功克隆到启动子和信号肽下游,PCR 鉴定图见图 1。

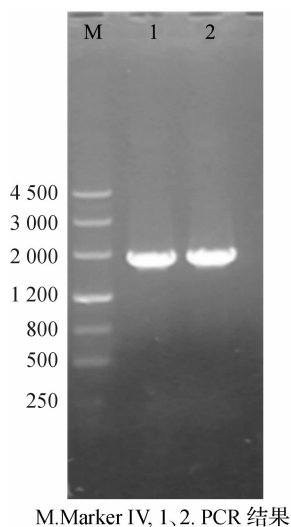


图1 重组枯草芽孢杆菌的 PCR 鉴定

### 2.2 纤维素酶 EGA 的表达及酶活力分析

为减少枯草芽孢杆菌自身分泌的蛋白水解酶对外源蛋白的降解,以枯草芽孢杆菌蛋白酶缺失型菌株 WB700 为宿主菌,重组菌 pAUsp-*ega*/WB700 培养 24 h 后,培养基上清液以羧甲基纤维素钠(CMC-Na)为底物测定表达得到的纤维素酶 EGA 的活力达到 1 120 U/L。

### 2.3 纤维素酶 EGA 的性质分析

#### 2.3.1 pH 对纤维素酶 EGA 的活性以及稳定性的影响

以 CMC-Na 为底物测定纤维素酶 EGA 的水解活力,得到酶反应的最适 pH 值为 6.0。图 2 为 WB700 阳性菌株培养 24 h 后的培养基上清在不同的 pH 缓冲液(pH 3~9)中 65℃ 水解反应,以最高酶活力为对照,计算得到纤维素酶 EGA 的相对活力作曲线。如图 2 显示,在 pH 6.0 条件下纤维素酶 EGA 的酶活力最高。

图 3 为 WB700 阳性菌株培养 24 h 的表达培养基上清在不同 pH 缓冲液(pH 3~9)中,37℃ 保温 3 h 后

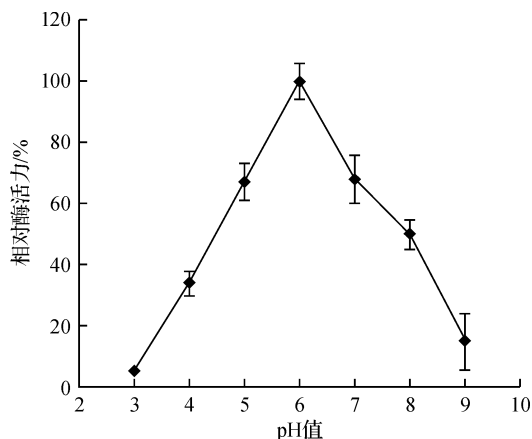


图2 纤维素酶 EGA 的最适反应 pH 曲线

测定 65℃ 水解反应,以最高酶活力为对照,计算得到纤维素酶 EGA 的相对活力作曲线。如图 3 显示,在 pH 5.0~6.0 条件下纤维素酶 EGA 的酶活力稳定。

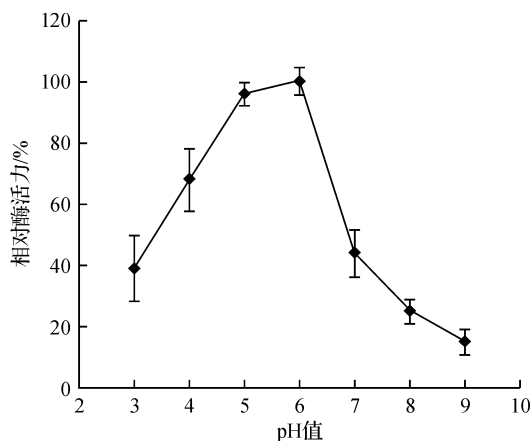


图3 纤维素酶 EGA 的 pH 稳定性曲线

#### 2.3.2 温度对纤维素酶 EGA 的活性以及稳定性的影响

纤维素酶 EGA 反应的最适温度为 60℃,图 4 为 WB700 阳性菌株培养 24 h 后的培养基上清在 pH 6.0 的缓冲液中 40~80℃ 不同温度下反应,以最高酶活力为对照,计算得到纤维素酶 EGA 的相对活力作曲线,图 4 显示 60℃ 时酶的活力最大。

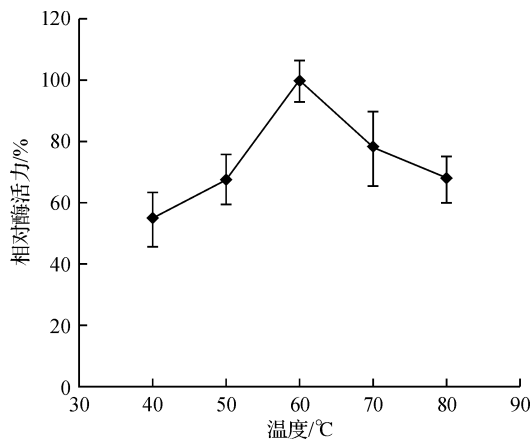


图4 纤维素酶 EGA 的最适反应温度曲线

纤维素酶 EGA 在 40℃ 条件下热稳定性最好, 40℃ 保温 2 h 后仍有 60% 以上的残余活力。随温度升高, 纤维素酶 EGA 的稳定性下降, 50℃ 保温 2 h 后仍有 50% 以上的残余活力, 而 80℃ 保温 1.5 h 后完全丧失水解活力。图 5 为 WB700 阳性菌株培养 24 h 后表达培养基上清分别在相应的 40~80℃ 温度下保温 0.5、1、1.5、2 h 后在 pH 6.0 的缓冲体系中, 65℃ 水浴反应 10 min, 以保温前的上清同条件反应作为对照, 计算得到的相对活力作曲线。图 5 显示, 纤维素酶 EGA 随温度升高稳定性下降, 在 40℃ 时稳定性最好。

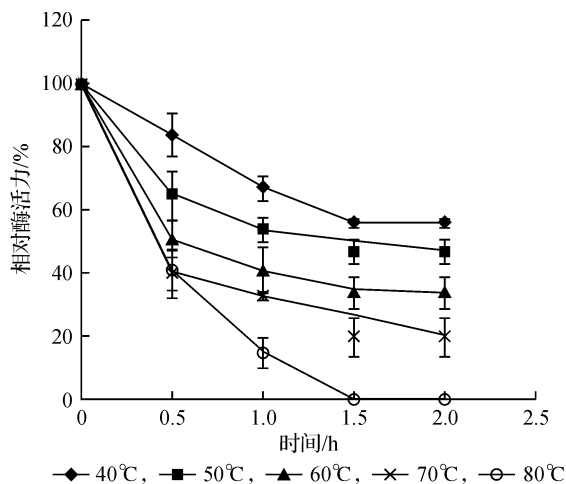


图 5 纤维素酶 EGA 的温度稳定性曲线

### 3 讨论

传统基因重组操作中外源基因多采用宿主菌胞内表达, 后期需要菌体收集、破碎等繁琐的过程, 同时因细胞破碎带来的大量杂蛋白使目的产物提取纯化变得十分困难, 虽然可以添加一些如多聚组氨酸等分子标签进行亲和层析, 然而其过高成本而限制工业化的大规模应用。枯草芽孢杆菌是一种革兰氏阳性菌, 细胞壁结构简单, 有较强的分泌能力, 能将胞内蛋白直接分泌到培养基中, 可简化蛋白质的生产程序, 降低生产成本。随着对枯草芽孢杆菌这一基因工程表达系统的研究的深入, 多种外源基因已在枯草芽孢杆菌中得到分泌表达, 并且表达的外源蛋白仍具原有的生物学活性<sup>[15-16]</sup>。

本文以福寿螺胃液共生菌株 *Bacillus* sp. Strain AC-1 来源的纤维素酶 EGA 为研究对象, 构建了分泌表达 EGA 的重组枯草芽孢杆菌 pAUsp-ega/WB700, 该表达系统含有淀粉酶的强启动子 PamyQ 和果胶酶 Pel-4 信号肽。重组菌在淀粉为底物的培养基中培养 24 h 后, 培养基上清酶活达到

1 120 U/L, 比原始菌株提高了 6 倍<sup>[10]</sup>。重组 EGA 保持了天然酶大部分特性, 其最适 pH 为 6.0, 并且在酸性环境下稳定。表明 EGA 是一种适合福寿螺胃液酸性环境的纤维素酶。重组 EGA 最适温度在 60℃, 高于大多数芽孢杆菌分泌的纤维素内切酶<sup>[17-20]</sup>, 并在该温度保温 2 h 后仍保持 40% 活性, 这些特性预示在纤维素酶 EGA 具有工业应用潜力。

纤维素酶是生物体所产生的生物活性物质, 它可以安全、高效地降解天然纤维素物质成为简单糖进而用于发酵生产燃料乙醇。对于解决在当今能源危机、碳排放超标等问题有重要意义, 然而蛋白质的生产成本制约了纤维素酶的广泛应用。随着分子生物学技术的发展, 对纤维素酶研究与应用的进一步深入, 对其研究也取得了很大的进展。本实验成功构建了一个高效的分泌表达载体, 成功的表达了具有良好应用潜力的纤维素 EGA, 为今后从分子水平以及发酵水平上提高纤维酶 EGA 产量、进行酶性质分析以及酶的晶体结构分析提供了一个很好的平台。

### 参考文献:

- [1] 刘晓晶, 李田, 翟增强. 纤维素酶的研究现状及应用前景[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1920-1921, 1924.
- [2] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 36.
- [3] 杨利平, 蔡水文, 罗玲, 等. 生物乙醇生产及纤维素酶的开发进展[J]. 西部资源, 2012(3): 132-134.
- [4] Lynd L R, Weimer P J, Van Zyl W H, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [5] 刘萌, 战利, 红霞, 等. 纤维素酶及纤维素酶基因工程学研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9515-9517.
- [6] 黄妙容, 刘德武, 吴珍芳. 福寿螺多功能纤维素酶基因 egx 的克隆及其体外功能性表达[J]. 中国农业科学, 2011, 44(17): 3641-3648.
- [7] Singh A, Hayashi K. Microbial cellulases: protein architecture, molecular properties and biosynthesis[J]. Advances in Applied Microbiology, 1995, 40: 1-44.
- [8] Eveleigh D E, Mandels M, Andreotti R, et al. Measurement of saccharifying cellulose[J]. Biotechnology for Biofuels, 2009, 2(1): 1-8.
- [9] Webb E C. Enzyme nomenclature: a personal retrospective[J]. Federation of American Societies for Experi-

- mental Biology Journal, 1993, 7(12): 1192-1194.
- [10] Li Yan-Hong, Ding Ming, Wang Ji, et al. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1[J]. Appl Microbiol Biochnol, 2006, 70(4): 430-436.
- [11] Tjalsma H, Noback M A, Bron S, et al. *Bacillus subtilis* contains four closely related type I signal peptidases with overlapping substrate specificities: constitutive and temporally controlled expression of different sig gene[J]. J Biol Chem, 1997, 272(41): 25983-25992.
- [12] Ogasawai N. Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes[J]. Res Microbiol, 2000, 151(2): 129-134.
- [13] Doi R H, Wong S L, Kawamura. Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins[J]. Trends Biotechnol, 1986, 4(9): 232-235.
- [14] Chang S. Engineering for protein secretion in gram-positive bacteria[J]. Methods Enzymol, 1987, 153: 507-516.
- [15] Olmos S J, Contreras F R. Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(4): 369-373.
- [16] Emilia M F, Duc L H, Isticato R, et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner[J]. Vaccine, 2004, 22(9/10): 1177-1187.
- [17] Bera-Maillet C, Arthaud L, Abad P, et al. Biochemical characterization of MI-ENG1, a family 5 endoglucanase secreted by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(11): 3255-3263.
- [18] Nakashima K, Azuma J. Distribution and properties of endo-beta-1, 4-glucanase from a lower termite, *Coptotermes formosanus*(Shiraki)[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2000, 64(7): 1500-1506.
- [19] Xu B, Hellman U, Ersson B, et al. Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-beta-1, 4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. Eur J Biochem, 2000, 267(16): 4970-4977.
- [20] Suzuki K I, Ojima T, Nishita K. Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai*[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(4): 771-778.

## Research on Expression of Cellulase EGA Gene in *Bacillus Subtilis* and Properties of Its Product

ZHANG Man-li, GENG Xin-wei, WANG Meng-ting, JIANG Lei, ZHAO Fu-kun, CHEN Wei

(Laboratory of Proteomics and Molecular Enzymology, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** *Bacillus subtilis* is an efficient exogenous protein expression strain which can secrete the target protein into extracellular culture medium. This research clones the gene order of cellulase EGAA from *ampullaria gigas* gastric juice symbiotic strain *Bacillus* sp. Strain AC-1 genome and establishes expression vector pAUsp-ega of recombinant *Bacillus subtilis* of cellulase *ega* using genetic engineering technology. This vector contains a strong promoter and signal peptide and can express exogenous protein with induction by amylum. The enzyme activity of culture medium supernatant obtained by recombinant cellulase *ega* with CMC-Na as substrate and *Bacillus subtilis* protease deletion form strain WB700 as host bacteria reaches 1 120 U/L. This cellulase shows the maximum hydrolysis vigor when pH=6.0; its most appropriate reaction temperature is 60°C. It has a good stability under acidic condition and has a good application prospect.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; cellulase EGA; secrete; sodium carboxymethyl cellulose

(责任编辑: 许惠儿)