

DOI:10.19951/j.cnki.1672-9331.2022.04.010

文章编号:1672-9331(2022)04-0099-09

引用格式:王璐潇,王亚梅,班宵逢,等.极端古细菌来源糊精脱支酶的生物信息学分析与高效制备[J].长沙理工大学学报(自然科学版),2022,19(4):99-107.

Citation: WANG Luxiao, WANG Yamei, BAN Xiaofeng, et al. Bioinformatics analysis and efficient preparation of dextrin debranching enzyme from extreme archaea[J]. Journal of Changsha University of Science & Technology (Natural Science), 2022, 19(4): 99-107.

# 极端古细菌来源糊精脱支酶的生物信息学分析与高效制备

王璐潇<sup>2</sup>, 王亚梅<sup>2</sup>, 班宵逢<sup>2</sup>, 李才明<sup>1,2,3</sup>, 顾正彪<sup>1,2,3</sup>, 李兆丰<sup>1,2,3</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 食品学院, 江苏 无锡 214122;  
3. 江南大学 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】丰富淀粉脱支酶酶制剂种类,充分利用淀粉质资源,实现葡萄糖、麦芽糖、环糊精等淀粉深加工产品的高效制备,开发挖掘一种来源于极端古细菌 *Thermococcus gammatolerans* (以下简称为 *T. gammatolerans*) 的糊精脱支酶基因。【方法】利用多种生物信息学分析工具对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶进行理化性质分析和结构预测;利用分子生物技术实现 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶在大肠杆菌中的胞外分泌表达,并通过优化发酵温度、发酵时间以及诱导剂添加量来提高酶产量。【结果】*T. gammatolerans* 糊精脱支酶是一种稳定性较高的亲水蛋白质,其氨基酸序列中不包含信号肽;将酶的DNA序列构建至含信号肽的pET-20b(+)载体中可实现 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达和胞外分泌。*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的最优发酵条件为:将 37 °C 温度条件下培养 12 h 的种子液接种到 TB 培养基中,在添加终浓度为 0.01 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactoside, IPTG)后,在 25 °C 温度条件下进行 84 h 诱导表达。在该条件下 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的胞外酶活力达到了 326.0 U/mL,为重组酶初始活力的 1.36 倍。【结论】*T. gammatolerans* 糊精脱支酶具有优良的理化性质和较高的表达水平,在淀粉糖工业生产中具有潜在应用价值。

**关键词:** 糊精脱支酶;极端古细菌;生物信息学分析;异源表达;高效制备

中图分类号:Q814

文献标志码:A

## 0 引言

淀粉脱支酶(starch debranching enzyme, SDE)是一类能够特异性水解支链淀粉及相关多糖中α-1,6糖苷键的水解酶。在淀粉的加工过程中,脱支酶可有效水解淀粉底物中的α-1,6糖苷键,促进其他淀粉酶对底物进一步作用,显著提高淀粉原料的转化率,降低生产成本。脱支酶已被广泛应

用于葡萄糖<sup>[1]</sup>、麦芽糖<sup>[2]</sup>、环糊精<sup>[3]</sup>及抗性淀粉<sup>[4]</sup>等产品的生产中,具有重要的应用价值。

根据底物特异性的差异,淀粉脱支酶可分为普鲁兰酶(pullulanase)、异淀粉酶(isoamylase)和糊精脱支酶(dextrin debranching enzyme, DDE)。普鲁兰酶的最小作用单元是麦芽糖基麦芽糖,其适合作用于较低分子量的糊精,对支链淀粉等大分子多糖中α-1,6糖苷键的水解活力较低<sup>[5]</sup>;异淀粉酶优先水解高分子量的糖原和支链淀粉中

收稿日期:2022-09-04;修回日期:2022-10-12;接受日期:2022-10-23

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD0901901);国家自然科学基金资助项目(31901628);国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180204)

通信作者:李兆丰(1979—)(ORCID:0000-0001-7571-1083),男,教授,主要从事淀粉生物技术方面的研究。

E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

投稿网址: <http://csjgxbzk.csust.edu.cn/cslgdxxbzk/home>

的 $\alpha$ -1,6糖苷键<sup>[6]</sup>,不能水解只有两个葡萄糖基的 $\alpha$ -1,6糖苷键,其底物侧链的最小单元至少包含3或4个葡萄糖单元<sup>[7]</sup>。目前,普鲁兰酶和异淀粉酶在工业上被广泛应用,但依然存在底物选择性差和热稳定性不足等问题。现有的高底物特异性脱支酶的种类较少,尤其缺少能对中等分子量麦芽糊精高效脱支的淀粉脱支酶,因而无法满足淀粉深加工产品的生产需求。因此,挖掘一种倾向于对中等分子量糊精发生作用的糊精脱支酶基因,并开发新型糊精脱支酶酶制剂是十分必要的。同时,从极端古细菌基因组中进行筛选,更有利于获得具有良好稳定性的糊精脱支酶基因。

脱支酶广泛存在于植物、动物和微生物中,但是天然宿主产酶水平有限,无法满足工业生产需求,同时极端菌的培养条件较为苛刻,无法实现工业化生产。为了满足实际应用的需要和实现脱支酶的商业化生产,研究者们借助基因工程手段,对不同来源的脱支酶进行克隆表达和发酵优化,以提高脱支酶的产量。目前,已实现了*Klebsiella aerogenes*、*Desulfurococcus mucosus*、*Pseudomonas amyloclavata*等来源的脱支酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*,以下简称为*E. coli*)<sup>[8-9]</sup>、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[10]</sup>、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[11]</sup>、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)<sup>[12]</sup>等中的异源表达。其中,大肠杆菌表达系统的遗传背景清楚透彻,用大肠杆菌表达系统对酶进行异源表达操作简便<sup>[13]</sup>,因而适于脱支酶的异源表达。但是,用大肠杆菌表达系统表达的异源蛋白容易在细胞内形成包涵体,这会较大程度地降低酶的催化性能,通常需要诱导来进行酶蛋白的胞外分泌或通过发酵调控来提高酶的产量和催化性能。生物信息学工具以生物信息数据库为基础,利用相

关算法和计算机软件对基因信息进行挖掘比对,对蛋白质的结构功能进行分析<sup>[14]</sup>,这样可高效获得酶蛋白的理化性质、分泌模式、跨膜结构等基本信息<sup>[15-17]</sup>。因此,本研究利用生物信息学工具对*Thermococcus gammatolerans*(以下简称为*T. gammatolerans*)来源的糊精脱支酶进行预测分析,并在此基础上通过分子生物技术和发酵优化策略实现其在大肠杆菌BL21(DE3)中的高效表达和胞外分泌,以期开发出具有价值的新型脱支酶酶制剂。

1 材料与试验

1.1 试验材料

大肠杆菌JM109和BL21(DE3)、质粒pET-20b(+)均保藏于江南大学食品学院淀粉质资源开发与利用研究室内;质粒pMD19-T simple购自宝日医生物技术(北京)有限公司;限制性内切酶*Nco*I、*Xho*I、T4 DNA连接酶、*Ex Taq* HS DNA聚合酶、琼脂糖、超级感受态细胞制备试剂盒、质粒抽提试剂盒、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D- thiogalactoside, IPTG)和氨苄青霉素均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;分子级酵母粉和胰蛋白胨均购自Oxoid公司(英国);标准蛋白分子量、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)配制试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 糊精脱支酶的生物信息学分析

利用表1列出的在线生物信息学分析工具对*T. gammatolerans*糊精脱支酶的理化性质、分泌特性、蛋白质表面性质以及结构特征进行预测和分析。

表1 生物信息学分析工具  
Table 1 Tools applied for bioinformatics analysis

功能	软件	网站
蛋白质理化性质分析	ProtParam	<a href="https://web.expasy.org/protparam/">https://web.expasy.org/protparam/</a>
信号肽预测与分析	SignalP 5.0 server	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0</a>
亲/疏水性预测分析	ProtScale	<a href="https://web.expasy.org/protscale/">https://web.expasy.org/protscale/</a>
跨膜结构预测	TMHMM 2.0 Server	<a href="https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0">https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0</a>
二级结构预测	SOPMA	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html</a>
三级结构预测	AlphaFold2	<a href="https://alphafold.ebi.ac.uk/">https://alphafold.ebi.ac.uk/</a>

### 1.2.2 糊精脱支酶基因的克隆

以 *T. gammatolerans* amylo- $\alpha$ -1, 6-glucosidase 基因组为模板,设计引物进行聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增,得到两端含有 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性酶切位点的糊精脱支酶基因片段。引物设计如下:

1) 正向:5'CCATGGATGAGAACCATCTTAGCC 3'(标有下划线的部分为 *Nco* I 酶切位点);

2) 反向:5'CTCGAGTCATAGGGTTCAACG3'(标有下划线的部分为 *Xho* I 酶切位点)。

将PCR产物连接至pMD19-T simple线性载体中,获得克隆载体pMD19-T simple/*dde*(*dde*表示糊精脱支酶基因),并转化至克隆宿主 *E. coli* JM109中,经测序验证正确后备用。

### 1.2.3 表达载体pET-20b(+)/*dde*的构建与转化

分别对载体pMD19-T simple/*dde*和pET-20b(+)质粒进行 *Nco* I、*Xho* I 双酶切,获得具有黏性末端的 *dde* 基因片段和线性pET-20b(+)载体,使用T4 DNA连接酶进行连接,之后将连接的产物转化至 *E. coli* JM109中。将测序验证正确的表达载体pET-20b(+)/*dde*转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3)中,获得基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)[pET-20b(+)/*dde*]。

### 1.2.4 SDS-PAGE

使用SDS-PAGE对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的胞外表达进行验证。按照碧云天试剂盒的使用说明书配制SDS-PAGE蛋白质凝胶。其中,浓缩胶的体积分数为5%,分离胶的体积分数为10%,染色液为考马斯亮蓝R250。蛋白凝胶电泳需在染色1~2 h后过夜脱色。

### 1.2.5 重组糊精脱支酶的诱导表达及发酵条件优化

按体积分数4%的接种量将种子培养液接至50 mL的发酵培养基中进行产酶发酵,并探究不同发酵条件,如发酵培养基、发酵温度、发酵时间以及诱导剂添加量对产酶量的影响,确定最优发酵条件。

### 1.2.6 糊精脱支酶活力的测定

对UTSUMI等<sup>[18]</sup>的方法稍做修改,以质量浓度为0.01 g/mL的支链淀粉溶液为底物,用碘法对糊精脱支酶活力进行测定。

### 1.2.7 数据处理

试验结果用3次独立试验的平均值和标准偏差表示;作图使用Origin软件;显著性分析用SPSS 20.0软件通过单因素方差分析来实现,显著性水平取  $P < 0.05$ 。

## 2 结果分析

### 2.1 糊精脱支酶的生物信息学分析

#### 2.1.1 蛋白质理化性质的预测

使用ProtParam软件对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的理化性质进行预测。*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的分子式为  $C_{3116}H_{4877}N_{831}O_{895}S_{10}$ ,氨基酸总数为620个,分子质量为68 621.63 Da,理论等电点为6.35,不稳定指数为39.98,总平均亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)的值为-0.154。由此可见, *T. gammatolerans* 糊精脱支酶是稳定的亲水性蛋白。

#### 2.1.2 信号肽的预测与分析

本研究利用SignalP 5.0 server软件对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的信号肽进行预测和分析,结果如图1所示。从图1可以看出,在 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶氨基酸序列中存在分泌通路信号肽、双精氨酸转运(twin-arginine translocation, TAT)通路信号肽和脂蛋白信号肽的概率分别为0.001 9、0.000 2和0.000 2,说明其本身不存在信号肽序列。

#### 2.1.3 亲/疏水性的预测与分析

本研究利用ProtScale软件分析 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的亲/疏水性,结果如图2所示。从图2可以看出, *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的最低分峰值为-3.178,对应第274位的脯氨酸,其为亲水性最强区;最高分峰值为2.889,对应第246位的丝氨酸,其为疏水性最强区。此外,其他位置氨基酸分值的分布较均匀,但亲水性氨基酸数量偏多,说明 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶是一种亲水性蛋白质。

#### 2.1.4 蛋白质跨膜结构的预测与分析

本研究利用TMHMM 2.0 Server软件对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的跨膜结构进行预测,结果如图3所示。从图3可以看出,跨膜信号无波动,说明 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶不存在跨膜结构,可在原核表达系统中对其进行表达。

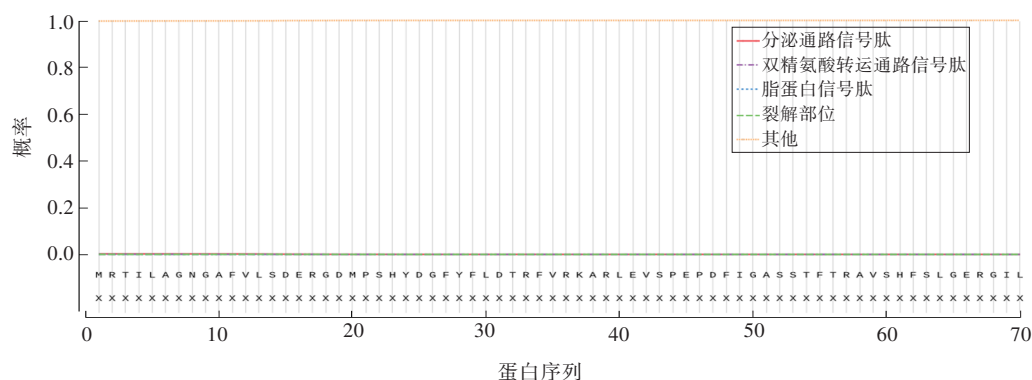


图1 糊精脱支酶信号肽的预测

Fig. 1 Signal peptide prediction of DDE

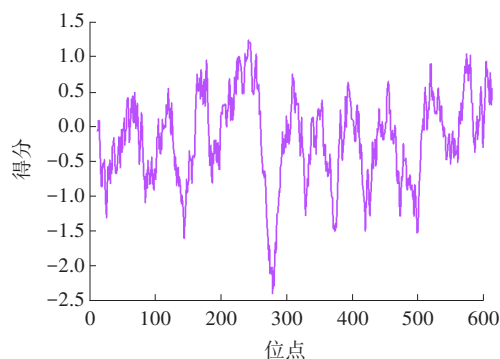


图2 糊精脱支酶亲/疏水性的预测

Fig. 2 Prediction of hydrophilicity and hydrophobicity of DDE

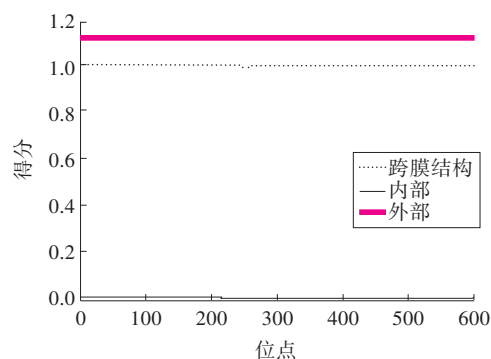


图3 糊精脱支酶跨膜结构的预测

Fig. 3 Prediction of the transmembrane structure of DDE

### 2.1.5 蛋白质二级结构的预测与分析

本研究利用SOPMA软件对*T. gammatolerans* 糊精脱支酶进行二级结构的预测与分析,结果如图4所示,图中蓝色表示 $\alpha$ -螺旋;绿色表示 $\beta$ -转角;红色表示延伸链;紫色表示无规则卷曲。从图4可以看

出,*T. gammatolerans* 糊精脱支酶蛋白结构中无规则卷曲的占比最高(36.94%),其次为 $\alpha$ -螺旋(34.03%)和延伸链(21.61%), $\beta$ -转角(7.42%)的占比最低。

### 2.1.6 蛋白质三级结构的预测与分析

本研究利用AlphaFold2对*T. gammatolerans* 糊

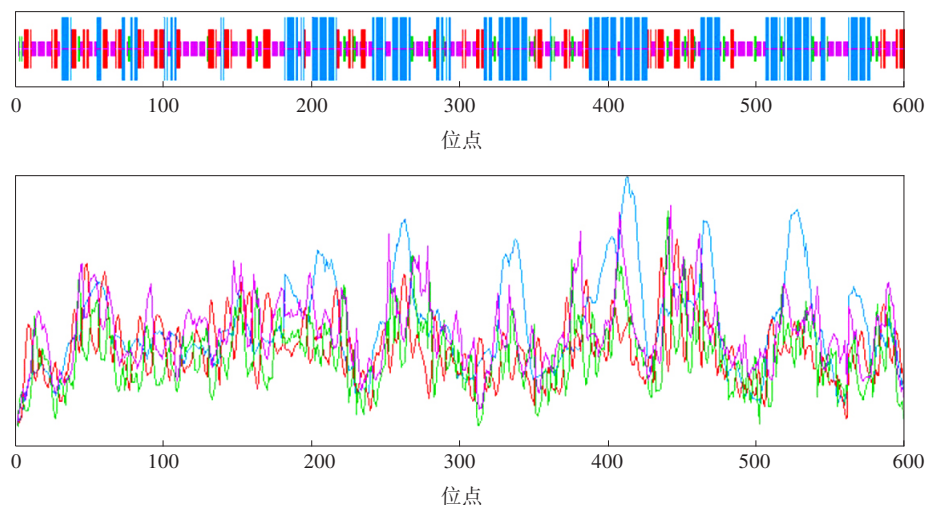


图4 糊精脱支酶二级结构的预测

Fig. 4 Secondary structure prediction of DDE



精脱支酶的三级结构进行预测,结果如图5所示。从图5可以看出,该酶的三级结构主要由 $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠和无规则卷曲组成,这与二级结构的预测结果基本一致。*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的整体结构由两个结构域组成,分别为由 $\alpha$ -螺旋组成的桶状结构和由 $\beta$ -折叠组成的三明治结构。上述预测所得的三级结构可为后续探究*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的构效关系和理性设计奠定基础。



图5 糊精脱支酶三级结构的预测

Fig. 5 Tertiary structure prediction of DDE

## 2.2 糊精脱支酶大肠杆菌表达系统的构建

*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的表达载体 pET-20b(+)/*dde* 的构建流程如图6所示。本研究通过双酶切法构建分泌型表达载体 pET-20b(+)/*dde*,将测序验证为正确的质粒转化至宿主 *E. coli* BL21(DE3)中,得到基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3) [pET-20b(+)/*dde*],并对该菌进行发酵表达,然后对发酵液进行离心处理,取上清液进行SDS-PAGE蛋白电泳验证,结果如图7所示(图中M为蛋白相对分子质量标准)。从图7可以看出,目标蛋白(分子量为68.6 kDa)条带清晰,说明*T. gammatolerans* 糊精脱支酶实现了在大肠杆菌中的胞外分泌。发酵所得重组*T. gammatolerans* 糊精脱支酶的初始酶活力为240.2 U/mL。

## 2.3 重组糊精脱支酶的发酵优化

### 2.3.1 种子生长曲线与种龄的确定

基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)[pET-20b(+)/*dde*] 的生长曲线如图8所示。从图8可以看出,在培养时长为0~6 h时,菌体处于生长延滞期;在培养时长为6~14 h时,菌体处于对数生长期;在培养了14 h之后,菌体进入生长稳定期。因此,可选择培养了12 h处于对数生长期的种子进行接种发酵。

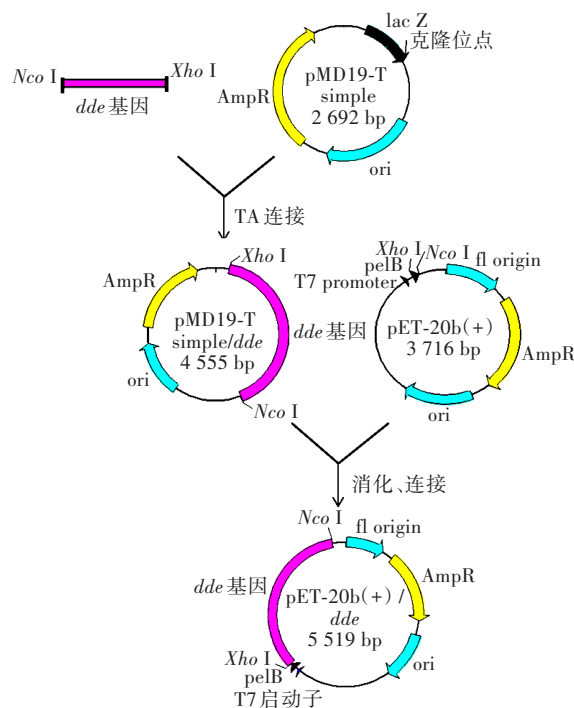


图6 表达载体 pET-20b(+)/*dde* 的构建

Fig. 6 Map of expression plasmid pET-20b(+)/*dde*

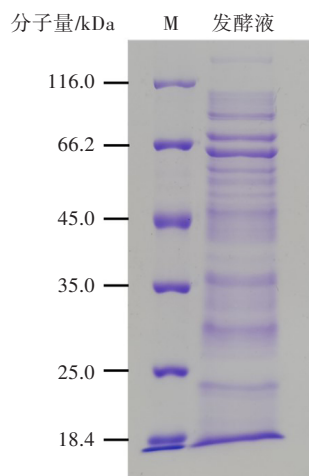


图7 糊精脱支酶在大肠杆菌中分泌表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of DDE expression and secretion in *E. coli*

### 2.3.2 发酵培养基的选择

不同发酵培养基对糊精脱支酶胞外生产的影响如图9所示,图中,每个数值均为3次平行试验的平均值,柱状图上不同字母表示显著性差异( $P < 0.05$ ),后图同此。在图9中, LB(luria broth)为营养液混合琼脂培养基, SOB(super optimal broth)为一种加富培养基, SOC(super optimal broth with catabolite repression)为一种可抑制分解代谢的超

优肉汤培养基, SB (super broth) 和 TB (terrific broth) 为两种不同的超级肉汤培养基。从图 9 可以看出, 由 TB 培养基发酵的重组糊精脱支酶胞外酶活力最高, 在 25 °C、200 r/min 的条件下摇瓶发酵 72 h, 其胞外酶活力可达到 240.2 U/mL, 是 LB 培养基发酵重组酶活力的 3 倍左右。与其他培养基相比, TB 培养基具有更多的营养成分和较好的 pH 缓冲能力, 可对重组糊精脱支酶起稳定作用。因此, 可选择 TB 培养基作为发酵培养基进行重组糊精脱支酶的生产。

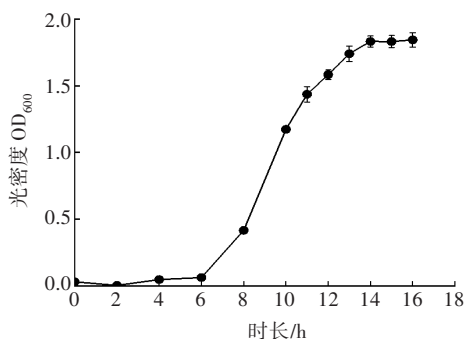


图 8 大肠杆菌的生长曲线

Fig. 8 Growth curve of *E. coli*

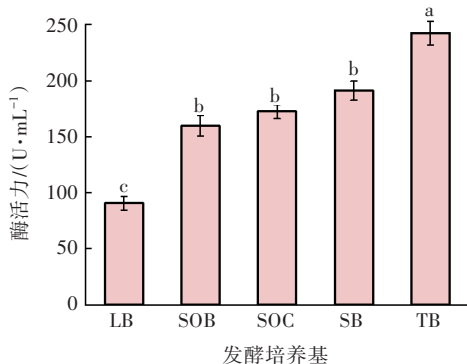


图 9 发酵培养基对糊精脱支酶胞外生产的影响

Fig. 9 Effects of fermentation medium on extracellular production of DDE

### 2.3.3 发酵温度和时间对重组糊精脱支酶生产的影响

发酵温度和时间对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶胞外生产的影响如图 10 所示。从图 10 可以看出, 较低的发 酵温度有利于 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的胞外分泌, 在 25 °C 将其发酵培养 84 h 后, 胞外酶活力可达到 326.0 U/mL。 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的酶活力随发酵时间的延长呈现先上升后下降的趋势。因此, 糊精脱支酶的发酵温度应控制在 25 °C, 发酵时长应控制在 84 h。

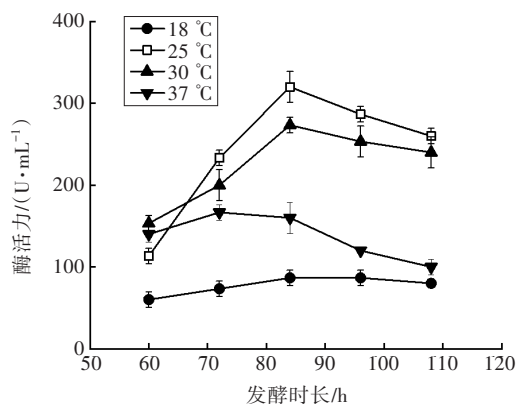


图 10 发酵温度和时间对糊精脱支酶胞外生产的影响

Fig. 10 Effects of induction temperature and time on the extracellular production of DDE

### 2.3.4 诱导剂浓度对重组糊精脱支酶生产的影响

诱导剂浓度对重组糊精脱支酶的生产也具有一定的影响, 试验研究结果如图 11 所示。从图 11 可以看出, 低浓度的诱导剂 IPTG 更有利于重组糊精脱支酶的胞外表达, 当诱导剂 IPTG 的浓度为 0.01 mmol/L 时, 胞外生产的酶活力达到了 326.0 U/mL; 当诱导剂 IPTG 的浓度大于 0.01 mmol/L 时, 糊精脱支酶胞外生产的酶活力随着诱导剂 IPTG 浓度的升高而有所降低; 在不添加诱导剂的情况下, 仍有部分重组酶被释放到胞外, 此时胞外生产的酶活力仅为 240.8 U/mL。

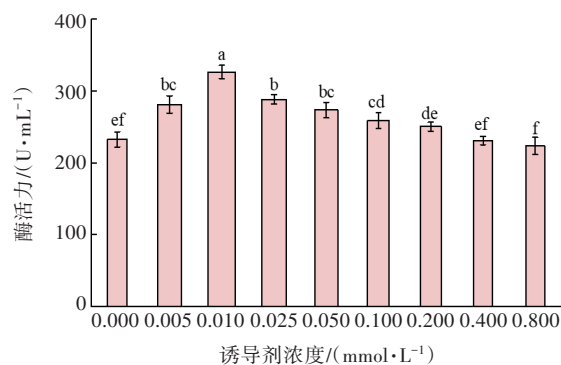


图 11 诱导剂 IPTG 浓度对糊精脱支酶胞外生产的影响

Fig. 11 Effects of IPTG concentration on extracellular production of DDE

## 3 讨论

对 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶进行异源表达可以突破天然宿主菌产酶水平低的限制, 实现脱支酶制剂的高效制备。通过分析目前国内外

的研究成果可知,脱支酶在大肠杆菌中的异源表达多以包涵体状态存在于细胞质或周质空间中<sup>[19-20]</sup>,难以分离纯化,不利于酶制剂的工业化制备。本研究通过生物信息学分析,发现 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的氨基酸序列不包含信号肽,因而构建了表达载体 pET-20b(+)/*dde*,并借助 pET-20b(+)质粒中的信号肽实现了 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的表达和胞外分泌,为 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的工业化制备奠定了基础。

重组酶的产量受多种因素影响,并可根据相关规律对其进行调控优化。在菌体的生长活化过程中,不同阶段的菌体具有不同的生理活性,而生理活性的差异会影响菌体后期的发酵产酶。处于对数生长期的种子,生理活性高、适应能力强、繁殖速度快<sup>[21]</sup>。在菌体的发酵培养过程中,发酵温度和时间对重组酶的分泌表达起着至关重要的作用。

本研究的结果表明,25℃为生产重组糊精脱支酶最适宜的温度。当发酵温度低于25℃时,胞外酶活力大幅降低,这是由于当发酵温度较低时,重组糊精脱支酶的转运效率降低,进而限制了糊精脱支酶的胞外分泌<sup>[22]</sup>。此外,较高的发酵温度(37℃)也不利于重组糊精脱支酶的胞外分泌,这是因为较高的温度下糊精脱支酶前体蛋白的合成速度较快,这使得蛋白未来得及跨膜转运就在细胞质中形成了难溶于水的包涵体,阻碍了糊精脱支酶的胞外分泌。

糊精脱支酶的酶活力随发酵时间的延长呈现先上升后下降的趋势,在发酵培养糊精脱支酶84h时酶活力最高,这是由于随着发酵时间的延长,菌体通过消耗TB培养基中的营养物质进行了自身的生长繁殖,与此同时也产生了大量的细胞代谢产物。有害代谢产物不断积累,阻碍了菌体的生长繁殖,从而降低了胞外产酶的水平。除发酵温度和时间外,IPTG的添加激活了宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)中T7 RNA聚合酶基因的转录机制,故IPTG的添加量对于重组糊精脱支酶的胞外表达水平具有一定的影响。本研究的结果表明,当诱导剂IPTG的浓度为0.01 mmol/L时,胞外生产的酶活力最高,达到了326.0 U/mL;当诱导剂IPTG的浓度大于0.01 mmol/L时,糊精脱支酶的酶活力随着诱导剂IPTG浓度的升高有所降低,这

可能是较高浓度的诱导剂IPTG使得糊精脱支酶前体蛋白的合成速度太快,在细胞质内形成了包涵体所致。

综合上述试验结果,获得重组糊精脱支酶的最优发酵条件为:将37℃温度条件下培养12h的种子液接种到TB培养基中,添加终浓度为0.01 mmol/L的诱导剂IPTG,并在25℃温度条件下进行84h诱导表达。这样可实现重组糊精脱支酶的最高生产水平,即326.0 U/mL,为重组酶初始活力的1.36倍。

优良的脱支性能和较大的分泌表达量使得重组 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶有望成为一种新型淀粉脱支酶酶制剂,并被应用于淀粉工业中。

## 4 结论

本研究利用生物信息学工具预测分析了 *T. gammatolerans* 糊精脱支酶的理化性质,在此基础上,采用分子生物技术实现了其在大肠杆菌系统中的异源表达,并通过发酵条件的优化提高了酶的产量。*T. gammatolerans* 糊精脱支酶具有优良的脱支活力和独特的底物特异性,经大肠杆菌异源表达后实现了较高的产酶水平,因此该糊精脱支酶应用前景广阔。

本文研究结果可为开发新型淀粉脱支酶酶制剂和提高淀粉深加工产品的品质提供理论指导。

## [参考文献]

- [1] 赵伟超.重组普鲁兰酶在麦芽糊精糖化中的工艺条件优化及其稳定性研究[D].无锡:江南大学,2015.  
ZHAO Weichao. Process optimization of pullulanase-involved saccharification of maltodextrin and stabilization of the recombinant pullulanase[D]. Wuxi: Jiangnan University,2015.
- [2] 曹玉华,王关斌,李玉珍,等.普鲁兰酶在制备麦芽糖浆中的应用研究[J].山东化工,2018,47(23):41-43.DOI:10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2018.23.015.  
CAO Yuhua,WANG Guanbin,LI Yuzhen,et al.Study on the application of pullulanase in the preparation of malt syrup[J].Shandong Chemical Industry,2018,47(23):41-43.DOI:10.19319/j.cnki.issn.1008-021x.2018.23.015.
- [3] WANG L,WU D,CHEN J,et al.Enhanced production of  $\gamma$ -cyclodextrin by optimization of reaction of  $\gamma$ -cyclodextrin glycosyltransferase as well as synchronous

- use of isoamylase[J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 3072–3076. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.149.
- [4] LU Z H, BELANGER N, DONNER E, et al. Debranching of pea starch using pullulanase and ultrasonication synergistically to enhance slowly digestible and resistant starch[J]. Food Chemistry, 2018, 268: 533–541. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.115.
- [5] 段绪果, 吴敬. 微生物 GH13 家族淀粉脱支酶研究进展[J]. 微生物学报, 2013, 53(7): 648–656. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.2013.07.014.
- DUAN Xugu, WU Jing. Advances in studying microbial GH13 starch debranching enzyme: a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(7): 648–656. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.2013.07.014.
- [6] XIA W, ZHANG K, SU L Q, et al. Microbial starch debranching enzymes: developments and applications[J]. Biotechnology Advances, 2021, 50: 107786. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2021.107786.
- [7] HARADA T. Isoamylase and its industrial significance in the production of sugars from starch[J]. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 1984, 1(1): 39–64. DOI: 10.1080/02648725.1984.10647780.
- [8] 苏红玉. 产普鲁兰酶菌株的筛选、基因克隆表达及酶学性质研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019. DOI: 10.27151/d.cnki.ghnlu.2019.003302.
- SU Hongyu. Isolation of strain producing pullulanase, cloning and expression of the pullulanase gene and its enzymatic characterization[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019. DOI: 10.27151/d.cnki.ghnlu.2019.003302.
- [9] TAKIZAWA N, MUROOKA Y. Cloning of the pullulanase gene and overproduction of pullulanase in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(2): 294–298. DOI: 10.1128/aem.49.2.294-298.1985.
- [10] DUFFNER F, BERTOLDO C, ANDERSEN J T, et al. A new thermoactive pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: cloning, sequencing, purification, and characterization of the recombinant enzyme after expression in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(22): 6331–6338. DOI: 10.1128/JB.182.22.6331-6338.2000.
- [11] CHEN P H, LIN L L, HSU W H. Expression of *Pseudomonas amyloclavata* isoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Biotechnology Letters, 1998, 20(8): 735–739. DOI: 10.1023/A:1005382602683.
- [12] 李兵. 普鲁兰酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(6): 24–27.
- LI Bing. Cloning and expression of pullulanase gene in pichia yeast[J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48(6): 24–27.
- [13] BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 411–421. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8.
- [14] 曹浩. 应用生物信息学手段的酶催化性能优化研究[D]. 北京: 北京化工大学, 2017.
- CAO Hao. Research on modification of catalytic character of enzymes base on bioinformatics[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2017.
- [15] 富玉竹, 李欣, 李晔, 等. 16 种微生物蛋白酶的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 65–72. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.010.
- FU Yuzhu, LI Xin, LI Ye, et al. Bioinformatics analysis of 16 microbial proteases[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 65–72. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.010.
- [16] 巴德仁贵, 李爽, 王绍萌, 等. 几种植物类伐昔洛韦水解酶基因的生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(2): 382–391. DOI: 10.13417/j.gab.034.000382.
- BADE Rengui, LI Shuang, WANG Shaomeng, et al. Bioinformatical analysis of VACVase-like gene from several plants[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(2): 382–391. DOI: 10.13417/j.gab.034.000382.
- [17] 赵婷, 姚雯轶, 王立梅. 副干酪乳杆菌乳酸脱氢酶的生物信息学分析[J]. 食品科学, 2011, 32(17): 250–253.
- ZHAO Ting, YAO Wenyi, WANG Limei. Bioinformatic analysis of genes encoding lactate dehydrogenase from *Lactobacillus paracasei*[J]. Food Science, 2011, 32(17): 250–253.
- [18] UTSUMI Y, NAKAMURA Y. Structural and enzymatic characterization of the isoamylase1 homo-oligomer and the isoamylase1-isoamylase2 hetero-oligomer from rice endosperm[J]. Planta, 2006, 225(1): 75–87. DOI: 10.1007/S00425-006-0331-Z.
- [19] 邢岩. 普鲁兰酶的异源表达与可溶性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2018. DOI: 10.27117/d.cnki.ghenu.2018.000148.
- XING Yan. Heterologous expression and soluble research of pullulanase[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018. DOI: 10.27117/d.cnki.ghenu.2018.000148.
- [20] XU P, ZHANG S Y, LUO Z G, et al. Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2021, 37(3): 1–10. DOI: 10.1007/S11274-021-03010-9.
- [21] 李才明.  $\beta$ -环糊精葡萄糖基转移酶在枯草杆菌中的分泌表达及其热稳定性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.



- LI Caiming. Secretory expression in *Bacillus subtilis* and thermostability of  $\beta$ -cyclodextrin glycosyltransferase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [22] SHOKRI A, SANDÉN A, LARSSON G. Cell and process

design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 60(6): 654–664. DOI: 10.1007/s00253-002-1156-8.

## Bioinformatics analysis and efficient preparation of dextrin debranching enzyme from extreme archaea

WANG Luxiao<sup>2</sup>, WANG Yamei<sup>2</sup>, BAN Xiaofeng<sup>2</sup>, LI Caiming<sup>1,2,3</sup>, GU Zhengbiao<sup>1,2,3</sup>, LI Zhaofeng<sup>1,2,3</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:**[Purposes] The paper aims to enrich the categories of starch debranching enzymes, make full use of starch resources, and realize the efficient preparation of starch deep-processing products such as glucose, maltose, cyclodextrin, etc., a dextrin debranching enzyme (DDE) derived from the extreme archaea (*Thermococcus gammatolerans*, abbreviated as *T. gammatolerans*) was investigated. [Methods] The physicochemical properties and structure prediction of DDE from *T. gammatolerans* were carried out by bioinformatics analysis tools, and then molecular biotechnology was used to achieve its extracellular secretion expression in *Escherichia coli* (abbreviated as *E. coli*). Moreover, the enzyme yield was improved by optimizing fermentation temperature, fermentation time and the amount of inducer added. [Findings] DDE from *T. gammatolerans* is a hydrophilic protein with high stability, and no signal peptide is included in its amino acid sequence. The enzyme DNA sequence was constructed into pET-20b(+) vector containing a signal peptide, which contributed to achieve its protein expression and extracellular secretion in *E. coli* BL21(DE3). The optimal fermentation conditions were as follows: the seed medium cultured at 37 °C for 12 h was inoculated into TB medium, and isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside with a final concentration of 0.01 mmol/L was added to induce expression at 25 °C for 84 h. Under the control of these conditions, the extracellular enzyme activity of DDE was 326.0 U/mL, which was 1.36 times higher than the initial enzyme activity. [Conclusions] DDE from *T. gammatolerans* has excellent physical and chemical properties as well as a high expression level, inclining that this enzyme has potential application value in the industrial sugar productions of starch.

**Key words:** dextrin debranching enzymes; extreme archaea; bioinformatics analysis; heterologous expression; efficient preparation

**Manuscript received:** 2022-09-04; **revised:** 2022-10-12; **accepted:** 2022-10-23

**Foundation item:** Project (2019YFD0901901) supported by the National Key R & D Program of China; Project (31901628) supported by the National Natural Science Foundation of China; Project (JUFSTR20180204) supported by the National First-Class Discipline Program of Food Science and Technology

**Corresponding author:** LI Zhaofeng (1979—) (ORCID: 0000-0001-7571-1083), male, professor, research interest: starch biotechnology. E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

(责任编辑:石月珍;校对:赵冰;英文编辑:文李)