生 物 工 程 学 报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2009, April 25; 25(4): 542-548
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2009 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

食品生物技术

淀粉液化芽孢杆菌β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆及表达

李永仙[1,2], 谢焱[1,2], 朱林江[2], 张一心[2], 顾国贤[2], 李崎[1,2]

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122
2 江南大学生物工程学院 酿酒科学与工程研究室, 无锡 214122

摘 要: 为了比较不同的表达系统对β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因(*bgl*)的效果, 本研究将高产β-1,3-1,4-葡聚糖酶的淀粉液化芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 的 *bgl* 基因(GenBank Accession No. EU623974)克隆到 3 种不同的质粒载体中, 即构建 pEGX-4T-1-*bgl*、pET20b(+)-*bgl* 和 pET28a(+)-*bgl* 重组质粒。比较了 pEGX-4T-1-*bgl* 在不同 *Escherichia coli* 宿主中表达效果, 以及 pET20b(+)-*bgl* 和 pET28a(+)-*bgl* 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达效果。结果表明, *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 能够表达最高的重组β-1,3-1,4-葡聚糖酶酶活, 其总酶活可达(322.0±8.8) U/mL, 是出发菌在最适摇瓶发酵条件下产酶活的 40.1%。对该重组菌的产酶条件进行了分析, 结合 IPTG 和乳糖协同的诱导作用, 在基础产酶培养基中产最高总酶活为(1883.3±45.8) U/mL, 表明其具有良好的工业应用价值。

关键词: 淀粉液化芽孢杆菌, β-1,3-1,4-葡聚糖酶, 克隆表达, 大肠杆菌

Optimization of cloning and expression of β-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*

Yongxian Li[1,2], Yan Xie[1,2], Linjiang Zhu[2], Yixin Zhang[2], Guoxian Gu[2], and Qi Li[1,2]

1 *Key Laboratory of Industrial Biotechnology*, *Ministry of Education*, *Wuxi* 214122, *China*
2 *Laboratory of Brewing Science and Technology*, *School of Biotechnology*, *Jiangnan University*, *Wuxi* 214122, *China*

Abstract: To compare of performance of β-1,3-1,4-glucanase gene (*bgl*) in different expression systems, the β-1,3-1,4-glucanase gene (GenBank Accession No. EU623974) was amplified from *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 by PCR and was cloned into three vectors pEGX-4T-1, pET20b(+) and pET28a(+) to construct pEGX-4T-1-*bgl*, pET20b(+)-*bgl* and pET28a(+)-*bgl* recombinant plasmids. The pEGX-4T-1-*bgl* was transformed into three different *Escherichia coli* host strains. The pET20b (+)-*bgl* and pET28a (+)-*bgl* were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) respectively. Recombinant β-glucanase was expressed by IPTG inducement in these recombinants. *E. coli* BL21 (DE3)-pET28a (+)-*bgl* had the highest enzyme activity. In Luria-Bertani medium, the total enzyme activity was (322.0±8.8) U/mL, which was 40.1% of original strain in optimal shaking flask condition. This recombinant's performance was studied in Terrific Broth medium under inducement of IPTG and lactose at the same time., and the highest total enzyme activity could reach (1883.3±45.8) U/mL (818.8% of the original), which indicate that the recombinant strain has a good value in industry application.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, β-glucanase, cloning and expression, *Escherichia coli*

Received: April 8, 2008; **Accepted:** December 12, 2008
Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA020204), National Key Technology Research and Development Program (Nos. 2007BAK36B01, 2008BAI63B06).
Corresponding author: Qi Li. Tel: +86-510-85918176; Fax: +86-510-85805219; E-mail: liqi@jiangnan.edu.cn
国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2006AA020204), 国家科技支撑计划(Nos. 2007BAK36B01, 2008BAI63B06)资助。

β-葡聚糖是构成禾本科植物细胞壁的一种非淀粉性多糖, 它们是由β-D-葡萄糖残基通过β-1,3 或β-1,4 糖苷键排列成线状的葡聚糖[1]。在啤酒生产中, 因麦芽中含有较多β-葡聚糖, 往往会造成麦汁粘度过大致使过滤困难, 延长糖化醪过滤时间, 降低浸出物含量, 而且容易使成品啤酒产生早期雾浊从而影响保质期[2]。β-1,3-1,4-葡聚糖酶(EC3.2.1.73, 简称β-葡聚糖酶)是一种内切水解酶, 它能高效、专一地分解大麦β-葡聚糖, 在啤酒生产中添加此酶可将β-葡聚糖降解为低聚糖和葡萄糖, 降低麦汁粘度[3], 从而大大提高过滤速度, 增加生产效率。

天然产β-葡聚糖酶的微生物主要来自芽孢杆菌属, 国内外近一些年来陆续克隆和表达了一些芽孢杆菌属来源的β-葡聚糖酶基因, 它们在氨基酸和核酸序列上都显示出了较高的相似性[2], 此外, 一些非芽孢杆菌属的β-葡聚糖酶基因也得到了克隆和表达, 其中有的酶活已达到较高水平[4]。但是, 为了满足工业应用的要求, 酶的耐温性和酶的生产效率仍有待提高[5], 所以仍需研究不同来源的β-葡聚糖酶基因, 并优化其克隆表达系统, 以便于酶分子的定向改造和工程菌的高效生产。

大肠杆菌表达系统是目前应用最广、发展最完善的一种表达体系, 可以根据不同的表达策略表达目的蛋白质, 比如为了增加重组蛋白的可溶性 GST 融合表达、分泌型表达, 为了方便于目的蛋白的纯化而发展了各种标签融合表达等等。另外, 大肠杆菌的另一个显著特点是生长速率快, 可以实现高效生产, 且方便定向改造酶蛋白分子。因此本研究 3 种表达质粒载体 pEGX-4T-1、pET20b(+)和 pET28a(+)用于克隆表达本研究室高产β-葡聚糖酶的专利菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* BS5582 的 β-葡聚糖酶基因, 即比较 GST 融合表达、PelB 信号肽指导的分泌型表达和常用的带有强启动子和 *lac* 操作子的 pET28a(+)的组氨酸标签和 T7 标签的融合表达。结果表明, *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 具有最好的表达效果, 在基础产酶培养基中, 经 IPTG 和乳糖的协同诱导下, 能产高达(1883.3±45.8) U/mL 的总酶活, 具有很好的工业应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *菌株和质粒载体*

淀粉液化芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* BS5582 为本研究室保藏(专利号 ZL 200510038488.8); *E. coli* JM109、*E. coli* DH5α和 *E. coli* BL21(DE3), 质粒载体 pEGX-4T-1、pET20b(+)和 pET28a(+)由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心(CICIM-CU)提供。

1.1.2 *工具酶和试剂*

Taq DNA 聚合酶、dNTP 购自上海博彩生物科技有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、λDNA、蛋白质 Marker、氨苄青霉素、硫酸卡那霉素、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程公司; β-葡聚糖底物为 Sigma 公司产品; 引物由上海生工生物工程公司合成; 其他试剂均为进口或国产分析纯。正交试验所用的诱导剂 IPTG 溶液和乳糖溶液的浓度分别为 20 g/L 和 180 g/L。

1.1.3 *培养基*

淀粉液化芽孢杆菌和大肠杆菌培养均采用 Luria-Bertani(LB)培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母膏 5。重组菌产酶性能试验采用基础产酶培养基(Terrific Broth 培养基) (g/L): 蛋白胨 12, 酵母膏 24, 甘油 6, NaCl 10, KH_2PO_4 2.4, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 12.5。

1.2 方法

1.2.1 *淀粉液化芽胞杆菌染色体 DNA 的提取*

参照文献[6]采用 CTAB 法。

1.2.2 *β-葡聚糖酶基因的 PCR 扩增*

根据文献[7] 报道的相关序列(GenBank Accession No. M15674)设计引物, 于正反向引物 5′端分别引入 *Bam*H I 酶切位点和 *Xho* I 酶切位点(下划线表示), 因 pET20b(+)载体中以 *Bam*H I 酶切位点直接插入会导致移码, 故其正向引物设计与其他两者有所不同。引物序列如下:

正向引物:

PAG1-F1: 5′-ACATCGGATCCATGAAACGAGTGTTGCTAAT TCTTG-3′ [pEGX-4T-1, pET28a(+)];

PAG1-F2: 5′-ACATCGGATCCGATGAAACGAGTGTTGCTAATTCTTG-3′ [pET20b(+)];

反向引物:

PAG1-R: 5′-GTAGTCATCTCGAGTTATTTTTT TGTATAGCGCACCCAG-3′。

PCR 扩增条件如下: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 50 s, 56°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环; 4°C 保温。取 3 μL PCR 产物用于 1%的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 *表达载体的构建和目的基因测序*

分别用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切 PCR 扩增的β-葡聚糖酶基因片段和质粒 pEGX-4T-1、pET20b(+)、pET28a(+), 以 T4 DNA 连接酶与β-葡聚糖酶基因片段连接, 构建重组质粒 pEGX-4T-1-*bgl*、pET20b(+)-*bgl* 和 pET28a(+)-*bgl*, 将 pEGX-4T-1-*bgl* 采用 $CaCl_2$ 方法转化到 *E. coli* JM109、*E. coli* DH5α和 *E. coli* BL21(DE3), 而 pET20b(+)-*bgl* 和 pET28a(+)-*bgl* 分别转化 *E. coli* BL21(DE3), 采用菌落 PCR 鉴定出阳性转化子, 送上海生工生物工程公司进行目的基因测序。菌落 PCR 采用引物序列如下:

正向引物:

T7-F: 5′-TAATACGACTCACTATAGG-3′ [pET20b(+), pET28a(+)];

PAG-F: 5′-CGAGTGTTGCTAATTCTTG-3′ (pEGX-4T-1);

反向引物:

PAG-R: 5′-TGTATAGCGCACCCAGTC-3′。

1.2.4 *β-葡聚糖酶基因的诱导和表达*

将阳性转化子从斜面接入到 10 mL 含有适量抗生素的 LB 培养基中, 于 37°C、200 r/min 振荡培养过夜, 以 4%的接种量转接至 25 mL 新鲜液体 LB 培养基, 继续于 37°C、200 r/min 培养至 OD_{600}=1 左右, 在 30°C 下采用 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h。

1.2.5 *SDS-PGAE 分析*

取发酵液(含菌体)进行 SDS-PAGE 分析, 具体步骤参照文献[8]。

1.2.6 *产酶条件的初步优化*

根据文献[9]的报道, 采用乳糖和 IPTG 联合诱导可以提高重组蛋白的分泌性表达, 故首先在 LB 培养基中, 对影响产酶水平的关键性因素诱导温度、IPTG 和乳糖的添加量、诱导剂添加时间进行正交实验分析。再根据获得的结果, 在初始产酶培养基(TB)中进行产酶性能试验。

1.2.7 *酶活力的测定*

对发酵液(含菌体)和菌体分别采用超声波破碎处理, 取处理后的液体稀释一定倍数后测酶活, 前者的结果为总酶活, 后者为胞内酶活; 发酵液离心后的上清液直接稀释一定倍数后测酶活, 所得结果为胞外酶活。酶活测定方法采用 DNS 法[5]。β-葡聚糖酶活定义: 一定体积的酶液于 40°C、pH 6.5 下, 每分钟分解大麦β-葡聚糖产生 1 μmol 还原糖定义为 1 个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 β-葡聚糖酶基因(*bgl*)的扩增和测序

根据已知淀粉液化芽胞杆菌β-葡聚糖酶基因的序列设计引物, 以提取的淀粉液化芽孢杆菌染色体 DNA 为模板, PCR 扩增出约 700 bp 的 DNA 片段, 与预期大小基本一致。测序结果表明, 该片段全长 720 bp (GenBank Accession No. EU623974), 与文献[7]报道的序列中的 ORF 同源性达 98.6%。

2.2 表达载体 pEGX-4T-1-bgl 的构建及在三种宿主菌中的表达

将构建好的 pEGX-4T-1-*bgl* 分别转化 *E. coli* JM109、*E. coli* DH5α和 *E. coli* BL21 (DE3), 涂布 *Amp* 平板, 用引物 PAG-F/PAG-R 的菌落 PCR 验证阳性转化子, 3 种宿主的阳性转化子均扩增出一条约 700 bp 的条带, 条带大小符合预测值, 并对相应的阳性克隆子进行酶切验证和测序验证, 结果均完全符合要求(数据没有显示), 随后用于蛋白质表达实验分析。

为了增加重组蛋白的可溶性, 在初步采用 30°C 下诱导产物的表达, 将对 3 种重组菌用 IPTG 诱导后对发酵液进行 SDS-PAGE 分析和总的β-葡聚糖酶活性测定。SDS-PAGE 分析表明, 3 种菌经过诱导的重组菌均有比较明显的重组蛋白表达带均能表达相同的目的重组蛋白(其中在 *E. coli* JM109 中的表达情况如图 1), 重组蛋白其分子量约为 50 kD, 与预测的 GST 融合表达的 53 kD 的相对分子量基本一致。由图 1 可知, 与较低的细胞本底蛋白相比, 重组蛋白的条带比较明显, 表明具有较高拷贝数的表达质粒 pGEX-4T-1 能够高效地表达目的蛋白。

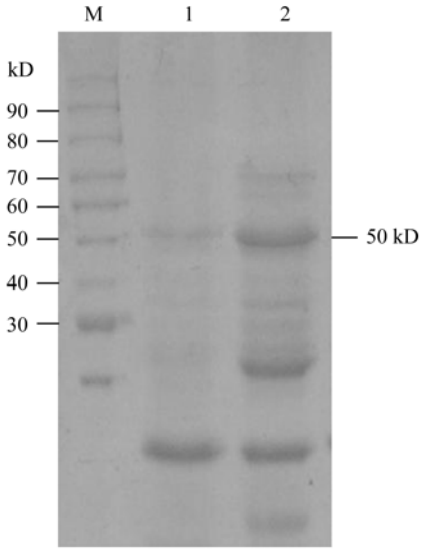

图 1 *E. coli* JM109-pEGX-4T-1-*bgl* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein produced by *E. coli* JM109-pEGX-4T-1-*bgl*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)-pEGX-4T-1-*bgl* (no induced); 2: the time of inducement is 5 h.

由于不同的大肠杆菌具有不同的生长速率及不同的生理表型, 所以比较了 3 种大肠杆菌表达的重组 β-葡聚糖酶的酶活, 结果如表 1 所示。其中 *E. coli* JM109-pEGX-4T-1-*bgl* 的总酶活和胞内酶活较高 (P<0.01), 但是 *E. coli* BL21 (DE3)-pEGX-4T-1-*bgl* 的胞外酶活比 *E. coli* JM109-pEGX-4T-1-*bgl* 高 (P<0.01)。

表 1 pEGX-4T-1-*bgl* 三种重组菌的表达酶活

Table1 1 Highest enzyme activity of three pEGX-4T-1-bgl transformants (mean ± SD, *n*=3)

Host strain	Total activity (U/mL)	Intracellular activity (U/mL)	Extracellular activity (U/mL)
E. coli JM109	182.7±5.3	155.5±2.5	46.8±0.9
E. coli DH5α	55.1±1.7	40.2±1.0	9.5±0.8
E. coli BL21(DE3)	141.1±4.9	108.1±3.1	54.7±1.0

2.3 表达载体 pET20b(+)-*bgl* 的构建及在 *E. coli* BL21 (DE3)中的表达

将构建好的 pET20b(+)-*bgl* 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 涂布 *Amp* 平板, 用引物 T7-F/PAG-R 的菌落 PCR 验证阳性转化子, 其目的扩增片段约 850 bp 的条带, 并将阳性转化子通过酶切验证和测序验证。

将 *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-*bgl* 用 IPTG 诱导后对发酵液进行 SDS-PAGE 分析和β-葡聚糖酶活性测定。SDS-PAGE 分析表明, 经过诱导产生的重组蛋白有 2 条明显的条带(图 2), 而重组蛋白分子量约为 27 kD, 与预测的 26.9 kD (胞内)的相对分子量基本一致。而另一个条带应为融合有信号肽的重组蛋白, 即未成熟的重组蛋白, 其预测分子量为 30.1 kD。经 IPTG 在 30°C 下诱导 5 h, 其发酵液的总酶活为(96.3±1.3) U/mL, 但胞外酶活很低, 只有 (16.5±1.1) U/mL, 这是由于 PelB 信号肽只能将目的蛋白分泌到细胞周质或外膜空间。

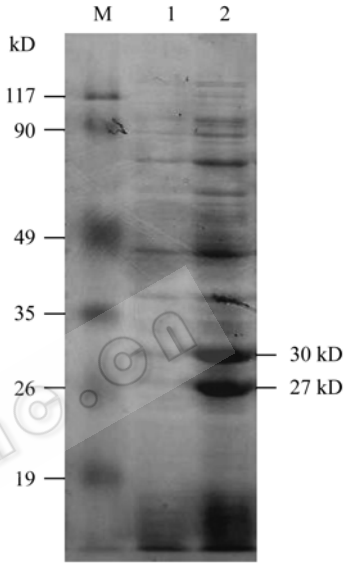

图 2 *E.coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-*bgl* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein produced by *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-*bgl*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)-pET20b(+)-*bgl* (no induced); 2: the time of inducement is 5 h.

2.4 表达载体 pET28a(+)-*bgl* 的构建及在 *E. coli* BL21 (DE3)中的表达

将构建好的 pET28a(+)-*bgl* 转化 *E. coli* BL21(DE3), 涂布 Kan 平板, 用引物 T7-F/PAG-R 的菌落 PCR 验证阳性转化子, 结果表明扩增出一条约 850 bp 的条带, 条带大小符合预测值, 说明目的基因已经成功连接到载体上, 随后通过酶切和测序验证。其质粒构建图谱如图 3。

将 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 用 IPTG 诱导后对发酵液进行 SDS-PAGE 分析和 β-葡聚糖酶活性测定。SDS-PAGE 分析表明, 经过诱导的重组菌有明显的重组蛋白表达带(图 4), 重组蛋白分子量约为 30 kD, 与预测的 30.4 kD 的相对分子量基本一致。该重组菌表达的总酶活为(322.0±8.8) U/mL, 胞内酶

活为(266.4±6.7) U/mL, 胞外酶活为(127.5±3.9) U/mL, 相比前面 4 种重组菌均有显著提高(P<0.01)。

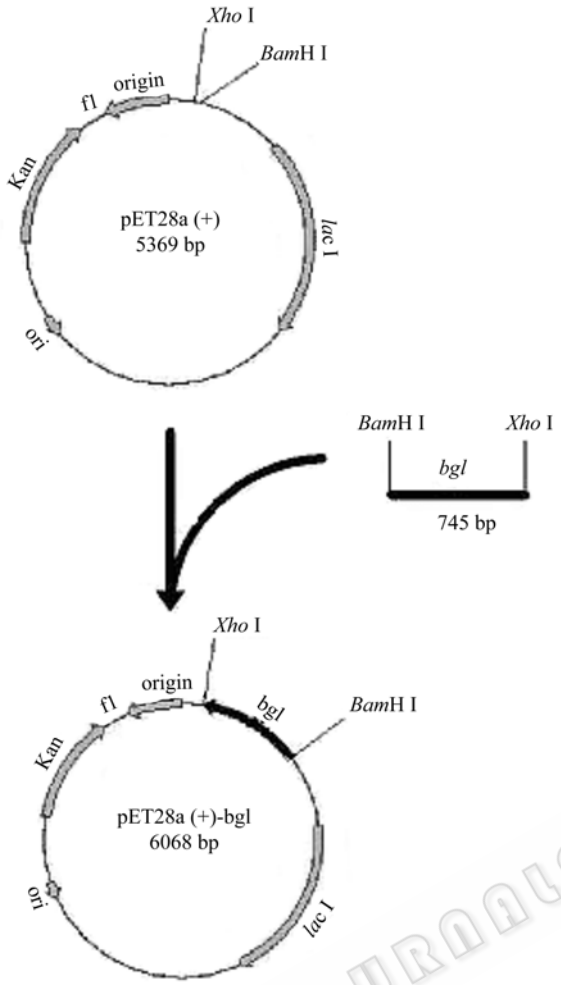

图 3 重组质粒 pET28a(+)-*bgl* 的构建图谱

Fig. 3 Physical map of recombinant plasmid pET28a(+)-*bgl*.

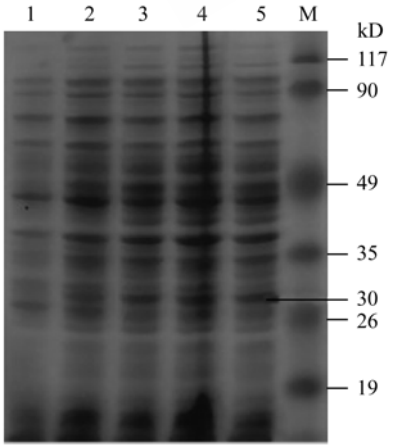

图 4 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein produced by *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* (no induced); 2–5: the time of inducement is 1, 3, 4, 5 h, respectively.

2.5 重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 产酶水平的分析

在 LB 培养基中影响产酶水平的关键因素进行正交试验分析, 实验结果如表 2 所示, 可知其最适产酶条件是当细胞生长 3 h (OD_{600}=1.2~1.5)时, 添加终浓度为 0.0336 mmol/L 的 IPTG 及 10 mmol/L 的乳糖, 并在 24°C 下诱导 6 h。采用该条件做验证实验, 其最高总酶活为(459.3±8.9) U/mL, 胞外酶活为(332.5±2.6) U/mL。由此条件在 TB 培养基中的产酶性能试验结果如表 3 所示, 诱导 9 h 产生的总酶活可达 (1883.3±45.8) U/mL, 其中胞外酶活可达(1024.3±149.1) U/mL, 占总酶活的 54.4%, 而胞外酶活的比例却是 12 h 时的高, 达 87.7%, 这可能与后期细胞衰老、自溶从而释放胞内的葡聚糖酶有关。

3 讨论

本研究比较了 *B. amyloliquefaciens* BS5582 菌株的β-葡聚糖酶基因的不同表达系统。由于质粒 pEGX-4T-1 在细胞中具有较高的拷贝数, 而且能够 GST 融合表达, 提高重组蛋白的可溶性, 所以本次构建重组质粒 pEGX-4T-1-*bgl*, 并将其转化到 *E. coli* JM109、*E. coli* DH5α和 *E. coli* BL21(DE3)三株菌中表达, 结果表明 *E. coli* JM109 中具有最好的表达效果, 而且 GST 融合表达的重组酶具有活性。但是其表达的酶活水平并非很高, 一方面是由于其采用的启动子为 Tac 启动子较 T7 启动子弱; 另一方面是融合的 GST 对酶的结构产生一定影响, 从而影响酶的催化效率。pET20b(+)-*bgl* 带有较强的 T7 启动子以及 N 端的 PelB 信号肽, 能使目的蛋白分泌到细胞周质中, 经过 SDS-PAGE 验证, 表明表达的蛋白分为重组蛋白和重组蛋白前体 2 种, 但是经过酶活分析, 该重组菌产生的酶活也不高, 也可能是融合片段对酶活有一定的负面影响。重组质粒 pET28a(+)-*bgl* 带有在 LacI 控制之下的 T7 启动子, 有效降低本底表达对宿主菌的毒害, 同时有效增加蛋白质的表达水平。经酶活分析, 该重组质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 产生了最高的酶活, 即(322.0±8.8) U/mL, 而出发菌在最适摇瓶发酵条件下产酶活为(802.7±10.4) U/mL, 所以重组菌产生的酶活为出发菌的 40.1%。

目前, 国内外对β-葡聚糖酶基因的克隆表达的研究已经较多[10–15], 如浙江大学吕文平等[10–13]采用

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

Times	IPTG (μL)		Lactose (mL)		Temperture (°C)		Time (h)		Extracellular activity (U/mL)
1	A1	5	B1	125	C1	24	D1	4	145.33±12.63
2	A1	5	B2	250	C2	27	D2	5	144.86±0.94
3	A1	5	B3	375	C3	30	D3	6	127.09±2.81
4	A1	5	B4	500	C4	33	D4	7	102.08±1.17
5	A2	10	B1	125	C2	27	D4	7	205.18±0.94
6	A2	10	B2	250	C3	30	D1	4	112.60±0.47
7	A2	10	B3	375	C4	33	D2	5	104.88±2,57
8	A2	10	B4	500	C1	24	D3	6	266.90±6.08
9	A3	15	B1	125	C3	30	D3	6	111.66±4.21
10	A3	15	B2	250	C4	33	D4	7	115.40±2.34
11	A3	15	B3	375	C1	24	D1	4	236.04±0.47
12	A3	15	B4	500	C2	27	D2	5	221.78±4.91
13	A4	20	B1	125	C4	33	D2	5	112.83±2.10
14	A4	20	B2	250	C1	24	D3	6	250.54±9.35
15	A4	20	B3	375	C2	27	D4	7	255.45±3.97
16	A4	20	B4	500	C3	30	D1	4	160.29±1.40
Blank	0		0		27		5		0.00
K1	519.36		575.00		898.81		654.26		2672.90
K2	689.56		623.39		827.26		584.35		
K3	684.88		723.46		511.64		756.19		
K4	779.10		751.05		435.19		678.10		
R	259.75		176.05		463.62		171.84		

表 3 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 在 TB 培养基中的产酶性能

Table 3 Performance of *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-bgl in TB culture medium (mean ± SD, *n*=3)

Time of inducement (h)	Extracellular activity (U/mL)	Total activity (U/mL)	Extracellular activity/Total activity (%)
3	306.0±10.9	937.0±57.9	32.7
6	511.9±55.2	1306.2±54.0	39.2
9	1024.3±149.1	1883.3±45.8	54.4
12	1391.7±58.4	1587.0±6.5	87.7

pET30a 载体对淀粉液化芽孢杆菌等不同来源的β-葡聚糖酶基因克隆和表达，但是报道的酶活并不高，其中 Teng 等[14]采用 pET28a(+)载体表达地衣芽孢杆菌的β-葡聚糖酶基因，产生了较高的酶活，对大麦β-葡聚糖底物的总酶活为 1286 U/mL(采用 MMBL 培养基)。本次采用 pET28a(+)质粒克隆表达了本实验室保藏的专利菌株 *B. amyloliquefaciens* BS5582 的β-葡聚糖酶基因，该基因(GenBank Accession No. EU623974)与 GenBank 收集序列中的 ORF 同源性为 98.6%，并对重组菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET28a(+)-*bgl* 产酶条件进行了分析，采用 0.0336 mmol/L 的 IPTG 和 10 mmol/L 的乳糖协同诱导，24°C 诱导，在 TB 培养基中产生的总酶活最高能够达到(1883.3±45.8) U/mL，胞外酶活最高可达总酶活的 87.7%，表明该 *bgl* 基因在 *E. coli* BL21(DE3)和 pET28a(+)系统中能够产生非常高的酶活，尤其是胞外酶活所占比例很高，因而在实际应用中甚至可以忽略胞内的很少部分的酶活，直接分离纯化胞外的部分已足够，这将大大降低生产成本，具有良好的工业应用潜力。

REFERENCES

[1] Papageorgiou M, Lakhdara N, Lazaridou A. Water extractable1,3-1,4-β-D-glucans from barley and oats: An intervarietal study on their structural features and rheological behaviour. *J Cereal Sci*, 2005, **42**: 213–224.

[2] Antoni P. Bacterial 1,3-1,4-β-glucanases: Structure,

function and protein engineering. *Biochem Biophys Acta*, 2000, **1543**: 361–382.

[3] Li YX, Guo GX, Yu Z. Study on application of high temperature resistant β-glucanase. *Liquor Making*, 2002, **29**(2): 81–83.
李永仙, 顾国贤, 俞中. 耐高温β-葡聚糖酶在啤酒糖化中的应用研究. 酿酒, 2002, **29**(2): 81–83.

[4] Wen T, Chen J, Lee S, *et al*. A truncated *Fibrobacter succino* genes 1,3-1,4-β-glucanase with improved enzymatic activity and thermo tolerance. *Biochemistry*, 2005, **44**: 9197–9205.

[5] Lu WP, Xu ZR, Li WF, *et al*. Cloning and expression of β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chin J Vet Sci*, 2005, **25**(3): 263–265
吕文平, 许梓荣, 李卫芬, 等. 淀粉液化芽孢杆菌β-1,3-1,4 葡聚糖酶基因的克隆和表达. 中国兽医学报, 2005, **25**(3): 263–265.

[6] Zhu LJ, Zeng FY, Zhao YZ, *et al*. Study on application of rep-PCR fingerprint in rapid identification of beer-spoilager. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(6): 1013–1020.
朱林江, 郑飞云, 赵亚洲, 等. Rep-PCR 应用于快速鉴定啤酒污染菌的研究. 生物工程学报, 2006, **22**(6): 1013–1020.

[7] Hofemeister J, Kurtz A, Borriss R, *et al*. The β-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene*, 1986, **49**(2): 177–187.

[8] Wang JZ, Fang M. Protein Technology Manual, Beijing: Science Press, 2000.
汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.

[9] Yang R, Wang SX, Chen ZY, *et al*. Enhancement of expression efficiency and solubility of recombinant protein in gene engineering by a new method. *Chin J Clini Rehabi*, 2006, **10**(29): 92–93.
杨瑞, 王淑秀, 陈正跃, 等. 提高基因工程中重组蛋白质表达效率及可溶性产物的一种新方法. 中国临床康复, 2006, **10**(29): 92–93.

[10] Lu WP, Xu ZR, Sun JY, *et al*. Cloning and expression of β-glucanase gene from *Closridium* sp.. *Bull Sci Technol*, 2005, **25**(1): 45–49.
吕文平, 许梓荣, 孙建义, 等. 一株嗜热梭菌β-葡聚糖酶基因的克隆和表达. 科技通报, 2005, **25**(1): 45–49.

[11] Li WF, Xu ZR, Lu WP, *et al*. Expression of β-glucanase Gene from *Bacillus* SP A3 in *Escherichia coli*. *J Shanghai Jiaotong Univ (Agri Sci)*, 2004, **22**(3): 278–280.
李卫芬, 许梓荣, 吕文平, 等. 芽孢杆菌 SP A3 β-葡聚糖酶基因在大肠杆菌中的表达. 上海交通大学学报(农业科学版), 2004, **22**(3): 278–280.

[12] Lu WP, Xu ZR, Sun JY, *et al*. Cloning and expression of β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus pumilu*. *J Zhejiang Univ (Agri & Life Sci)*, 2006, **30**(6): 679–683.
吕文平, 许梓荣, 孙建义, 等. 短小芽孢杆菌β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因克隆、表达及其酶特性研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, **30**(6): 679–683.

[13] Lu WP, Xu ZR, Du WL, *et al*. Cloning and expression of β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. *J Agri Biotechnol*, 2004, **22**(3): 278–280.
吕文平, 许梓荣, 杜文理, 等. 地衣芽孢杆菌β-1,3-1,4-葡聚糖酶基因的克隆和表达. 农业生物技术学报, 2004, **22**(3): 278–280.

[14] Teng D, Wang JH, Fan Y, *et al*. Cloning of β-1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72**: 705–712.

[15] Teng D, Fan Y, Yang YL, *et al*. Codon optimization of *Bacilluslicheniformis* β-1,3-1,4-glucanase gene and its expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **74**: 1074–1083.

Journals.im.ac.cn