

张 慧,邱日永,刘明杰,等. 极耐热性 β -葡萄糖苷酶基因克隆、超量表达及其在天然蓝色素工业化生产中的应用[J]. 江苏农业科学,2013, 41(7):19-22.

极耐热性 β -葡萄糖苷酶基因克隆、超量表达及其在天然蓝色素工业化生产中的应用

张 慧,邱日永,刘明杰,王未未,邵蔚蓝

(南京师范大学生命科学学院,江苏南京 210023)

摘要:从嗜热菌属的海栖热袍菌(*Thermotoga maritima* MSB8 ATCC43589)中扩增出编码极耐热性 β -葡萄糖苷酶基因 A,连接到新型热激载体 pHsh 上,得到重组质粒 pHsh-bglA-WT 和 pHsh-bglA-M,并在大肠杆菌中实现了高水平可溶性表达,比酶活分别为 25.7 U/mg 和 107.1 U/mg。通过热处理和 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析两步纯化方法处理后,经 SDS-PAGE 检测条带单一,比酶活达到 1 746.2 U/mg,纯化倍数 16.2,得率为 17.5%。 β -葡萄糖苷酶在以栀子苷和甘氨酸为原料的情况下,按照 8.8:1.4 的比例,80℃条件下反应 3 h,获得大量可食天然蓝色素,得到的天然蓝色素的色价 E(1%)为 426。

关键词: β -葡萄糖苷酶;可溶性表达;栀子苷;初级氨基酸;天然蓝色素;色价

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0019-04

天然色素主要通过各种天然动植物或微生物原材料提取而来的一类色素。天然色素提取成本较高,亦受到原材料来源的限制,因此,在合成色素出现后,以其价格低廉、稳定性好等优点迅速取代了天然色素的地位。近年来,随着人们对合成色素毒性的认识越来越深,认识到合成色素多为焦油类物质,不但没有任何营养价值,且食用过量的合成色素有致癌的危险^[1],因此,天然色素的研究及开发重新受到人们的关注。

目前,已经开发利用的天然色素主要有姜黄素、辣椒红色素、栀子黄色素、枣红色素等;但是作为三原色之一的天然蓝色素却极为罕见,这使天然色素的调色范围受到了极大的限制^[2-4]。可行的生产天然蓝色素的方法包括从念球藻中提取的蓝色素和通过栀子黄色素转化而来的蓝色素,但是从念球藻中提取的蓝色素藻蓝蛋白,在含乙醇的饮料以及不同 pH 值的水溶液中稳定性不好^[5]。由栀子黄色素转化而来的天然蓝色素在亚洲地区包括韩国、日本等国家得到了广泛的使用。栀子蓝色素以其在 pH 值、温度和光等方面的稳定性逐渐吸引了人们的注意力^[6]。

栀子蓝色素是通过提取栀子中含有的大量栀子苷类化合物经 β -葡萄糖苷酶的酶解作用得到京尼平,再与甘氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸或者谷氨酸钠等初级氨基酸在高温下反应而来^[5]。现在很多研究者都采用一步发酵的方法生产蓝色素,此种方法所得蓝色素产品质量差,分离提纯较困难,大量耗费原材料^[7-8]。针对这一现状,国内开展了两步法生产蓝色素

的研究。两步法生产天然蓝色素,首先将提取的栀子苷与 β -葡萄糖苷酶在低温下反应,获得京尼平,再与初级氨基酸在高温下反应得到质量较好的蓝色素^[9]。

本研究克隆并高效可溶性表达耐热性 β -葡萄糖苷酶基因 A,其拥有最适反应温度高(90℃)、温度稳定性好等优势^[10]。在生产天然蓝色素的过程中无需先在低温下反应这一步骤,而可直接将酶加入到栀子苷和初级氨基酸的混合物中,在高温下一步获得质量较高的蓝色素。这是对两步法生产天然蓝色素的进一步改进,节约了生产成本,使工业化获得高质量天然蓝色素具有了极大的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10B 与 *Escherichia coli* BL21(DE3)购于 Promega(USA);海栖热袍菌(*Thermotoga maritima* ATCC43589)购自美国菌种收藏中心;质粒 pHsh 为笔者所在实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、Taq Plus DNA 聚合酶和低分子量标准蛋白购自宝生物公司;质粒抽提试剂盒,割胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司;对硝基苯酚 β -D-葡萄糖苷(p -nitrophenyl β -D-glucoside, pNPG)购自 Sigma;DEAE Sepharose Fast Flow 填料购自 GE 公司;栀子苷标准品购自南京泽朗生物医药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养基及培养条件 大肠杆菌培养用 LB 培养基;电转化用 SOC 培养基;转化子的筛选用含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 固体培养基,配方参见文献[11];海栖热袍菌培养使用厌氧培养基,配方参见文献[12]。*T. maritima* 的接种与培养:用注射器按 0.5% 接种量接种于含有还原剂的培养基中,80℃静置培养 8 h。

1.2.2 基因操作 基因组 DNA 提取、DNA 内切酶的水解和

收稿日期:2013-03-11

作者简介:张 慧(1986—),男,河南商丘人,硕士研究生,主要从事基因工程方面的研究。E-mail:wwlmj163@sina.com。

通信作者:邵蔚蓝,教授,博士生导师,主要从事基因工程和代谢工程方面的研究。Tel:(025)85891836;E-mail:shaoweilan@njnu.edu.cn。

连接、DNA 片段的分离、感受态细胞的制备、以及基因的高效电转化方法均参照文献[11]。质粒的制备、琼脂糖凝胶回收 DNA 等操作按照 Qiagen 试剂盒使用指南进行。

1.2.3 β -葡萄糖苷酶基因 A 高效表达载体的构建 根据海栖热袍菌基因组序列上的基因 *TM0025* 序列设计并合成 1 对引物 P₁ 和 P₂ (表 1), 以 *T. maritima* 的基因组为模板进行 PCR 扩增。扩增参数为: 95 ℃ 5 min, 加入 *Taq* Plus DNA 聚合酶; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1.5 min, 循环 30 次; 72 ℃ 保温 10 min。PCR 扩增结束后, 电泳检测, 对 PCR 产物割胶回收、纯化、酶切、乙醇沉淀、浓缩, 并以适当比例与同样由 *Nco*I 和 *Hind* III 酶切的载体 pHsh 混匀, 连接, 转化 *E. coli* DH10B 构建含 β -葡萄糖苷酶基因 A 片段的表达载体 pHsh-bglA-WT。

为了获得 β -葡萄糖苷酶更高水平的表达, 对重组质粒 pHsh-bglA-WT 的转录起始区域的 mRNA 二级结构通过反向 PCR 进行优化, 设计 1 对引物 P₃ 和 P₄ (表 1)。扩增参数为: 95 ℃ 5 min, 加入 *Taq* Plus DNA 聚合酶; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 4.0 min, 循环 30 次; 72 ℃ 保温 10 min。PCR 产物割胶回收, 37 ℃ 磷酸化 1 h, 加入 T₄ DNA 连接酶过夜连接。连接液转化入 *E. coli* DH10B 得到 pHsh-bglA-M 高效表达质粒。

表 1 PCR 引物序列	
引物名称	核酸序列
P ₁	5'-ATAACCTGAAAAAGTTCCTGAAG-3'
P ₂	5'-CCCAAGCCTTCAGTCTTCCAGACCGTTG-3'
P ₃	5'-GGAGGATAACCTGAAAAAGTGTCTGAAGGATTCCTGAAGGATTCCTCTGGGG-3'
P ₄	5'-ATTTGTATATCTCCTTCTTTTCTAATATTAATAAGTCATTGGATCATGGGGATGTTT-3'

1.2.4 β -葡萄糖苷酶在 *E. coli* BL21(DE3) 中的诱导表达 将构建好的重组质粒分别转入 *E. coli* BL21(DE3) 和 DH10B, 挑取单菌落接入含有终浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中。30 ℃ 恒温箱培养至 *D*_{600 nm} 值为 0.6~0.8, 转入 42 ℃ 水浴锅中热激诱导 6 h, 离心, 收集菌体, SDS-PAGE 检测 β -葡萄糖苷酶基因 A 在原核表达载体中的表达水平。

1.2.5 重组蛋白的纯化 重组酶的诱导表达: 将重组菌种接种于含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 30 ℃ 恒温箱培养至 *D*_{600 nm} 值为 0.6~0.8, 转入 42 ℃ 水浴锅中热激诱导 6 h。粗酶液的制备: 将离心收集的细胞用 3 倍体积的 50 mmol/L pH 值 6.2 的 PBS 缓冲液重悬, 高压破碎法破碎细胞 (1 500 psi), 15 000 *g* 离心 20 min, 上清即为粗酶液。热处理: 取上清于 75 ℃ 下热处理 30 min 后, 15 000 *g* 离心 20 min。DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析: 装有 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱 (1.5 cm × 25 cm) 先用 50 mmol/L pH 值 6.2 PBS 缓冲液平衡, 上样后用同样的缓冲液洗涤未能与填料结合的蛋白, 直至 *D*_{280 nm} 值不变。用 50 mmol/L PBS 缓冲液 (pH 值 6.2) 配制 0.4 mol/L NaCl 的高盐洗脱液, 然后用 8 倍柱体积进行 0~0.4 mol/L NaCl 浓度梯度洗脱, 收集。检测每管的酶活性和蛋白纯度, 收集有酶活的试管合并, 硫酸铵沉淀、离心、重悬透析后为纯酶液 (含有 20% 甘油)。蛋白质浓度用 Bradford 法测定。

1.2.6 酶活力测定 β -葡萄糖苷酶的酶活力测定参照文献 [13]。酶活力单位定义为: 在该反应条件下, 1 min 内催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量。

1.2.7 色素的转化 为了获得质量较好的天然栀子蓝色素, 分别对底物、氨基酸以及重组蛋白的用量做了如下优化:

在 1 mL 的反应体系中分别加入 10 μ L 的甘氨酸 (140 mg/mL)、50 U 的重组蛋白以及底物栀子苷 (20 mg/mL) 120、160、200、240、280、320、360、400、440、480、520、560、600 μ L, 用 50 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 补加至终体积 1 mL。于 80 ℃ 反应 3 h, 测 *D*_{590 nm}。

在 1 mL 的反应体系中分别加入 440 μ L 的栀子苷 (20 mg/mL)、50 U 的重组蛋白以及甘氨酸 (140 mg/mL) 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 μ L, 用 50 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 补加至终体积 1 mL。于 80 ℃ 反应 3 h, 测 *D*_{590 nm}。

在 1 mL 的反应体系中分别加入 10 μ L 的甘氨酸 (140 mg/mL)、440 μ L 底物栀子苷 (20 mg/mL) 以及重组蛋白 4、8、12、16、28、36、48、60、80 U, 用 50 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 补加至终体积 1 mL。于 80 ℃ 反应 3 h, 测 *D*_{590 nm}。

栀子蓝色素色价的测定参见文献 [14]。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 重组质粒 pHsh-bglA-WT 的构建 以 *T. maritima* 的基因组 DNA 为模板扩增 β -葡萄糖苷酶基因 A 片段, 电泳检测结果 (图 1-A) 表明, 在 1.3 kb 附近有 1 条很亮的扩增带, 无明显的非特异带。PCR 产物克隆至热激载体 pHsh 中, 构建出重组质粒 pHsh-bglA-WT; 用限制性内切酶分别对重组质粒进行酶切鉴定, 重组质粒能被 *Hpa*I 单酶切得到 1 条 3.7 kb 的条带 (图 1-B); 同时将样品送往测序公司测序验证, 结果表明 bglA 确实已经插入到 pHsh 中。

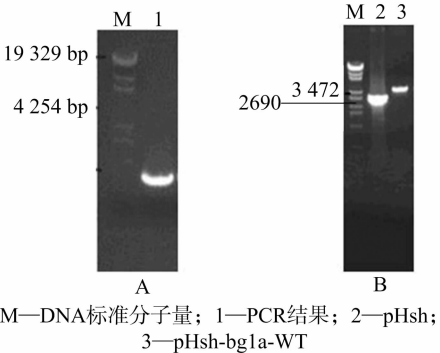


图1 β -葡萄糖苷酶 PCR 扩增片段和 *Hpa*I 酶切电泳图

2.1.1 重组质粒 pHsh-bglA-M 的构建 以 pHsh-bglA-WT 为模板, 引物 P₃ 和 P₄ 经反向 PCR 扩增后构建的重组高效表达质粒 pHsh-bglA-M。由图 2 可知, 优化后载体 pHsh-bglA-M 的 mRNA 二级结构中, 原来阻碍蛋白质翻译的发卡结构被彻底破坏, SD 序列和起始密码子 AUG 均被释放出来, 这样就能保证核糖体毫无阻碍地与 mRNA 结合, 起始重组蛋白的翻译。同时分析区域的自由能绝对值变小 (由优化前的 8.80 降低到优化后的 7.10), 形成的 mRNA 的结构不稳定, 有利于翻译的顺利进行。通过对优化后表达的 β -葡

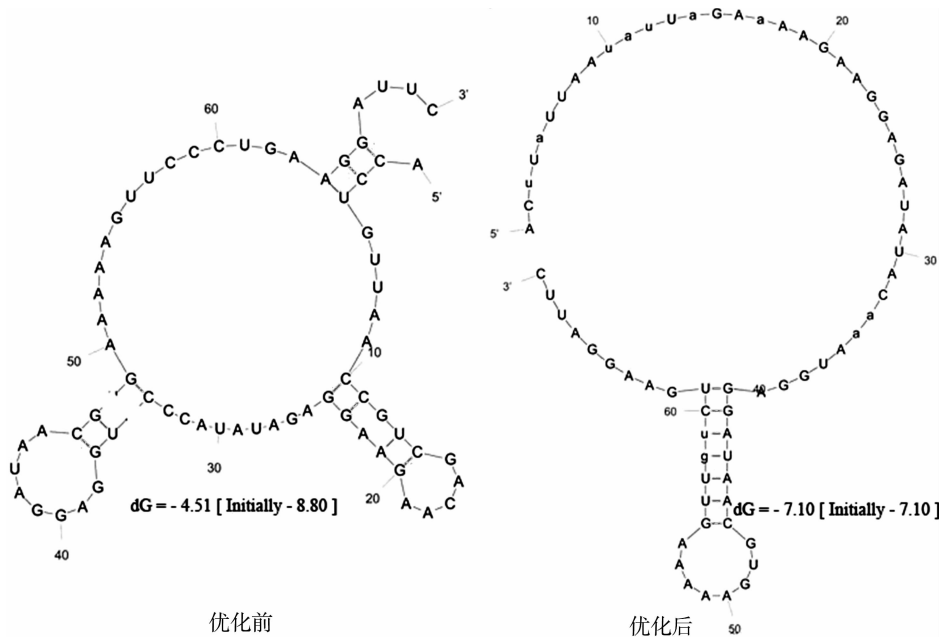


图2 重组质粒的二级结构优化

葡萄糖苷酶活性的测定,表明不同的载体以及不同的宿主细胞都起到了提高重组表达量的作用(表 2)。

表 2 不同重组质粒和宿主细胞对 β -葡萄糖苷酶表达的影响

重组菌	比酶活 (U/mg)
DH10B(pHsh - bglA - WT)	6.4
DH10B(pHsh - bglA - M)	88.5
BL21(pHsh - bglA - WT)	25.7
BL21(pHsh - bglA - M)	107.1

2.2 重组蛋白的表达纯化

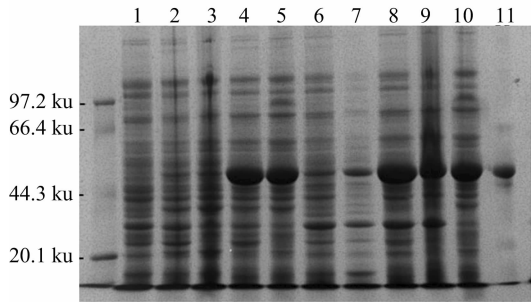
重组质粒 pHsh - bglA - WT 和 pHsh - bglA - M 分别转化 *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* DH10B, 30 ℃ 摇床中振荡培养, 42 ℃ 水浴摇床热激表达后收集菌体细胞, 破碎后进行 SDS - PAGE 检测, 电泳结果显示重组酶在分子量 48 ku 处有明显的蛋白表达带(图 3)。由表 3 可知重组菌的总酶活为 3 759.2 U, 其中 β -葡萄糖苷酶比酶活达到 107.1 U/mg。粗酶液经 75 ℃ 热处理后得到初步纯化的重组蛋白(图 3)。从表 3 可以看出总酶活(2 146.5 U)和总蛋白(5.6 mg)相比粗酶液而言都有所下降, 但比酶活(385.6 U/mg)是粗酶液的 3 倍多。

再通过阴离子交换层析进一步纯化得到电泳条带单一的纯酶(图 3)。如表 3 所示, 比酶活达到 1 746.2 U/mg, 是粗酶液的 16.2 倍, 得率为 17.5%, 纯化倍数为 4.5。

2.3 色素的转化

以底物栀子苷和初级氨基酸为原料, 加入 β -葡萄糖苷酶在高温下反应即可制得栀子蓝色素。研究发现, 其中底物栀子苷和初级氨基酸的比例最为关键, 不同的比例可能会产生不同的色素, 结果如图 4 所示。

由图 4 可知, 底物栀子苷添加量在 2.4 ~ 8.0 mg 时, $D_{590\text{ nm}}$ 不断升高, 但是肉眼观察含有紫色素, 故选择 8.8 mg 为



1—空白对照pHsh(DB10B);2—pHsh-bglA-WT(DH10B全细胞);3—WT(DH10B上清);4—pHsh-bglA-M(DH10B全细胞);5—M(DB10B上清);6—WT(BL21全细胞);7—WT(BL21上清);8—M(BL21全细胞);9—M(BL21上清);10—热处理;11—纯酶

图3 重组 β -葡萄糖苷酶的蛋白电泳分析

表 3 重组 β -葡萄糖苷酶的纯化

步骤	总蛋白量 (mg)	比酶活 (U/mg)	总酶活 (U)	回收率 (%)	纯化 倍数
粗酶液	35.1	107.1	3 759.2	100	1.0
热处理	5.6	385.6	2 146.5	57.1	3.6
DEAE - Sepharose FF	0.38	1 746.2	656.8	30.6	4.5

栀子苷最适添加量; 甘氨酸添加量在 0.14 ~ 1.26 mg 范围内时, 肉眼观察全为蓝色, 且吸光度不断升高, 甘氨酸添加量超过 1.4 mg 时, 肉眼观察呈现紫色, 故选择甘氨酸添加量为 1.4 mg; β -葡萄糖苷酶的作用是水解底物栀子苷的糖苷键, 重组蛋白添加量在 4 ~ 28 U 范围内时, 紫色由浅到深, 酶用量在 36 U 时, 肉眼观察呈蓝色, 酶用量大于 36 U 时, 虽然具有较高的吸光值, 但是夹杂着部分紫色。因此, 确定了生产栀子蓝色素时底物的最佳添加量为: 栀子苷 8.8 mg、甘氨酸 1.4 mg、 β -葡萄糖苷酶 36 U。根据此条件大量制备栀子蓝色素, 冷冻干燥后, 测其色价为 426。

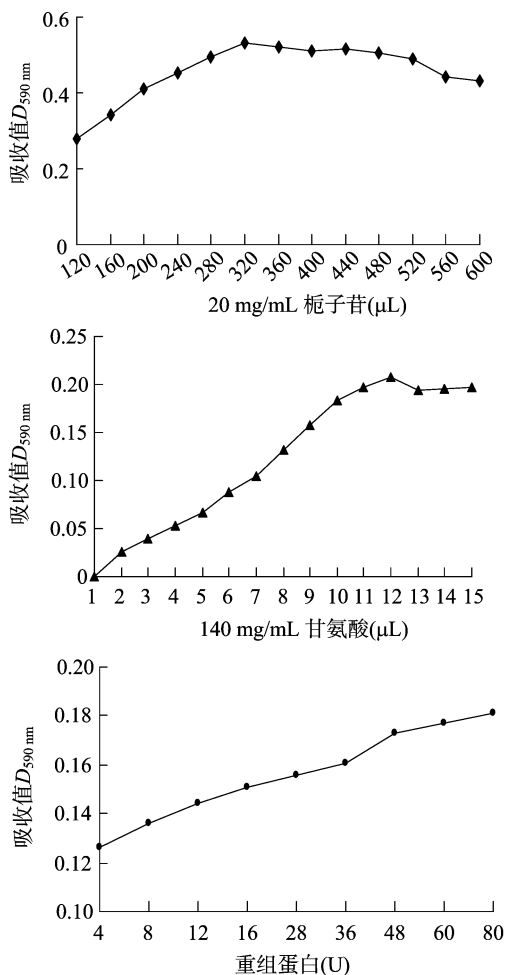


图4 色素转化中栀子苷、初级氨基酸和酶的最适用量

3 讨论与结论

本研究采用了具有自主知识产权的热激载体 pHsh 作为表达载体^[15],其可以直接通过热激的方法而不需要加入化学诱导剂就可以高效地表达外源基因。因为化学诱导剂如 IPTG 比较昂贵,是基因工程菌在工业化生产应用中的一个重要限制因素^[16]。通过热激诱导的方法能节省基因诱导表达的成本,无疑在工业化应用中具有巨大的优越性和现实意义。通过优化,重组蛋白实现了高效可溶性表达,且由于其在温度稳定性和最适反应温度方面的优势,赋予其实现栀子蓝色素低成本、高质量工业生产的可能性。目前,国内生产蓝色素包括从念球藻中提取藻蓝蛋白和栀子蓝色素。藻蓝蛋白由于其稳定性方面存在不足,限制了进一步的开发应用^[5]。栀子蓝色素的生产主要包括发酵法和两步法,其中发酵法由于发酵过程中产生的代谢物以及发酵培养基等的影响,其质量得不到保障。相比发酵法,两步法虽然可以获得较高得率的栀子蓝色素,但由于第一步使用的都是常温菌来源的 β -葡萄糖苷酶,其稳定性较差,限制了高产量栀子蓝色素工业化生产。本研究的 β -葡萄糖苷酶来源于极耐热性的海栖热袍菌,首先很容易实现高水平表达,同时简化了两步法的生产程序,而且重组蛋白的纯化简便易行,对实现高质量栀子蓝色素的工业化生产意义重大。凌敏等以栀子苷为原料生产栀子蓝色素

并且进一步分离纯化,得到的蓝色素色价为 234。本研究得到的蓝色素色价高达 426,而且未经纯化,已遥遥领先于国际市场标准^[17]。

参考文献:

- [1] 邹志飞,蒲民,李建军,等. 各国(地区)食用色素的使用现状与对比分析[J]. 中国食品卫生杂志,2010,22(2):112-121.
- [2] 赵辉,闫华晓. 一株产蓝色素海洋链霉菌及其色素性质的研究[J]. 食品研究与开发,2009,30(6):186-189.
- [3] 秦玉楠. 贵重天然食用色素-紫色素和蓝色素的提取技术[J]. 贵州化工,1995(1):45-46.
- [4] 李一苇,张明. 链霉菌-ZLT 产生的蓝色素性质研究[J]. 激光生物学报,2008,17(2):202-205,241.
- [5] Fujikawa S, Fukui Y, Koga K, et al. Brilliant sky blue pigment formation from gardenia fruits[J]. Fermentation Technology, 1987, 65(4): 419-424.
- [6] Paik Y, Lee C, Cho M, et al. Physical stability of the blue pigments formed from geniposide of gardenia fruits: effects of pH, temperature, and light[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1):430-432.
- [7] 李世杰,方尚玲,付向阳,等. 液态发酵产栀子蓝色素工艺条件的研究[J]. 食品科学,2001,22(8):46-49.
- [8] 吴志梅,梁华正,李佳春,等. 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及发酵栀子蓝色素的研究[J]. 现代食品科技,2005,21(3):53-54,57.
- [9] 章建国,余顺火,李先祥,等. 两步法生产栀子蓝色素工艺条件的研究[J]. 食品科学,2008,29(11):186-188.
- [10] Xue Y M, Song X F, Yu J J. Overexpression of β -glucosidase from *Thermotoga maritima* for the production of highly purified aglycone isoflavones from soy flour[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(12):2165-2172.
- [11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [12] Huber R, Langworthy T A, König H, et al. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up 90 °C [J]. Archives of Microbiology, 1986, 144(4):324-333.
- [13] Josef G, Wolfgang L, Karl-Heinz S. Purification and properties of recombinant β -glucosidase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 40(1):44-52.
- [14] 姚中铭,吕晓玲,褚树成. 栀子黄色素提取工艺的研究——微波提取法与传统浸提法的比较[J]. 天津轻工业学院学报,2001,16(4):20-23.
- [15] Wu H, Pei J J, Jiang Y, et al. pHsh vectors, a novel expression system of *Escherichia coli* for the large-scale production of recombinant enzymes[J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(6):795-801.
- [16] Wu H W, Pei J J, Shao W L, et al. Overexpression of GH10 endoxylanase XynB from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* by a novel vector with potential for industrial application[J]. Enzyme Microbiology Technology, 2008, 42(3):230-234.
- [17] 凌敏,焦裕健,李立明,等. 高色价栀子蓝色素的制备及其纯化工艺研究[J]. 食品工业科技,2009,30(9):262-264.