

耐酸高温 α -淀粉酶的分子设计及在芽孢杆菌中的分泌表达

报告人：余小霞

组号：G11

组员：张丰华、李哲、梁蒙、余小霞

报告内容

- 一、研究背景
- 二、生物信息分析策略
- 三、实验方案

一、研究背景

• 1.1.1 淀粉酶的分类

表 1-1 常见淀粉酶分类

Table 1-1 Classification of common Amylase

淀粉酶	来源	作用位点	水解底物	产物
液化酶	枯草芽孢杆菌 曲霉 大麦等植物	水解分子间的 α -1,4-糖苷键	淀粉	糊精, 低聚糖 葡萄糖
		从非还原末端每隔 两个单位水解 α -1,4-糖苷键	淀粉	麦芽糖
糖化酶	真菌类	从非还原性末端水解 α -1,4-糖苷键、 α -1,6-糖苷 键以及 α -1,3-糖苷键	淀粉	葡萄糖
		微生物	支链淀粉 糖原 普鲁兰糖	麦芽三糖 麦芽糖 直链淀粉

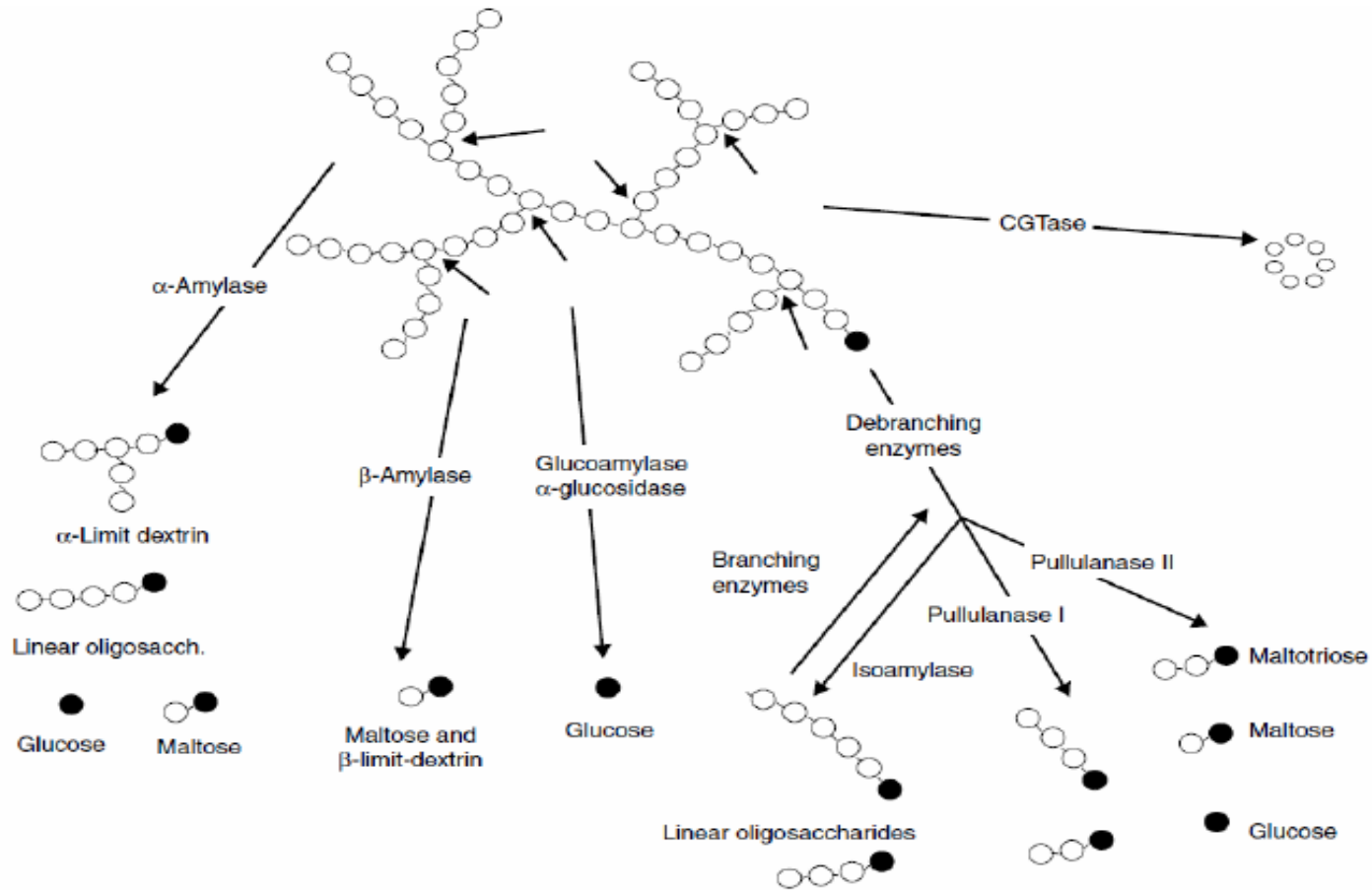


图 1-1 根据淀粉酶的作用淀粉的方式分类^[3]

Fig. 1-1 Classification of amylase according into the mode of action^[3]

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, et al. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective[J]. Process Biochem, 2003, 38:1599-1616

1.1.2 α -淀粉酶

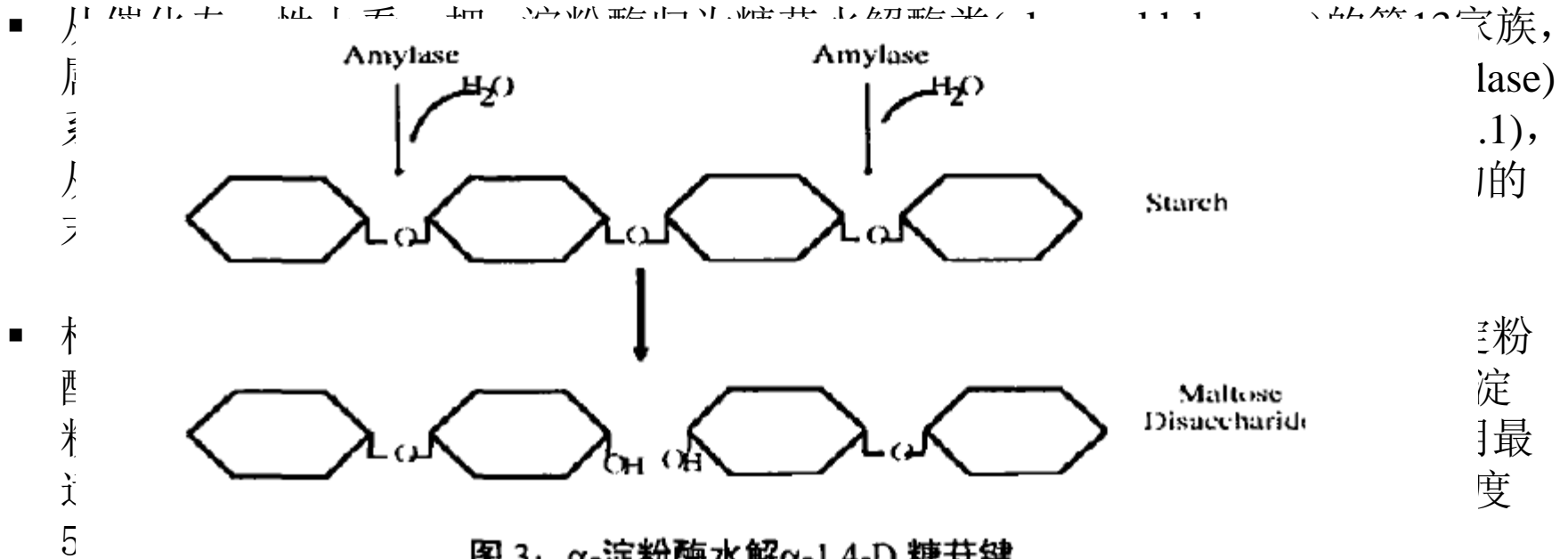


图 3: α -淀粉酶水解 α -1,4-D 糖苷键

Fig. 3 α -amylase hydrolyzes α -1,4 linkage

- 根据 α -淀粉酶作用的最适pH和对酸碱的稳定性, 把 α -淀粉酶分成酸性 α -淀粉酶、中性 α -淀粉酶和碱性 α -淀粉酶。大多数 α -淀粉酶都属于中性 α -淀粉酶, 一般最适pH6.0-7.0, 酸性 α -淀粉酶最适pH<5.5, 碱性 α -淀粉酶最适pH>8.0。

淀粉酶中以 α -淀粉酶应用最为广泛，已广泛应用于变性淀粉及淀粉糖、焙烤工业、啤酒酿造、酒精工业、发酵以及纺织等许多行业。

表 1-1 α -淀粉酶的工业用途

Table 1-1 The industrial application of α -amylase

用途	说明
淀粉加工工业	制造麦芽糖浆 制造饴糖 制造葡萄糖 制造各种粉末糊精 制造各种浆糊、粘着剂
酿造发酵工业	啤酒原料液化 酒精原料糖化、液化 酱油醋原料处理 其它以淀粉为原料的发酵工业中淀粉的液化
纺织品工业	各种纺织物退浆
面包工业	改善质量风味，缩短时间，节约用糖
医药工业	消化药、诊断试剂
饲料工业	与其他酶一起添加促进消化
其他	香料加工、造纸、石油压裂、果汁制造

• 1.1.3 工业应用对 α -淀粉酶的要求

双

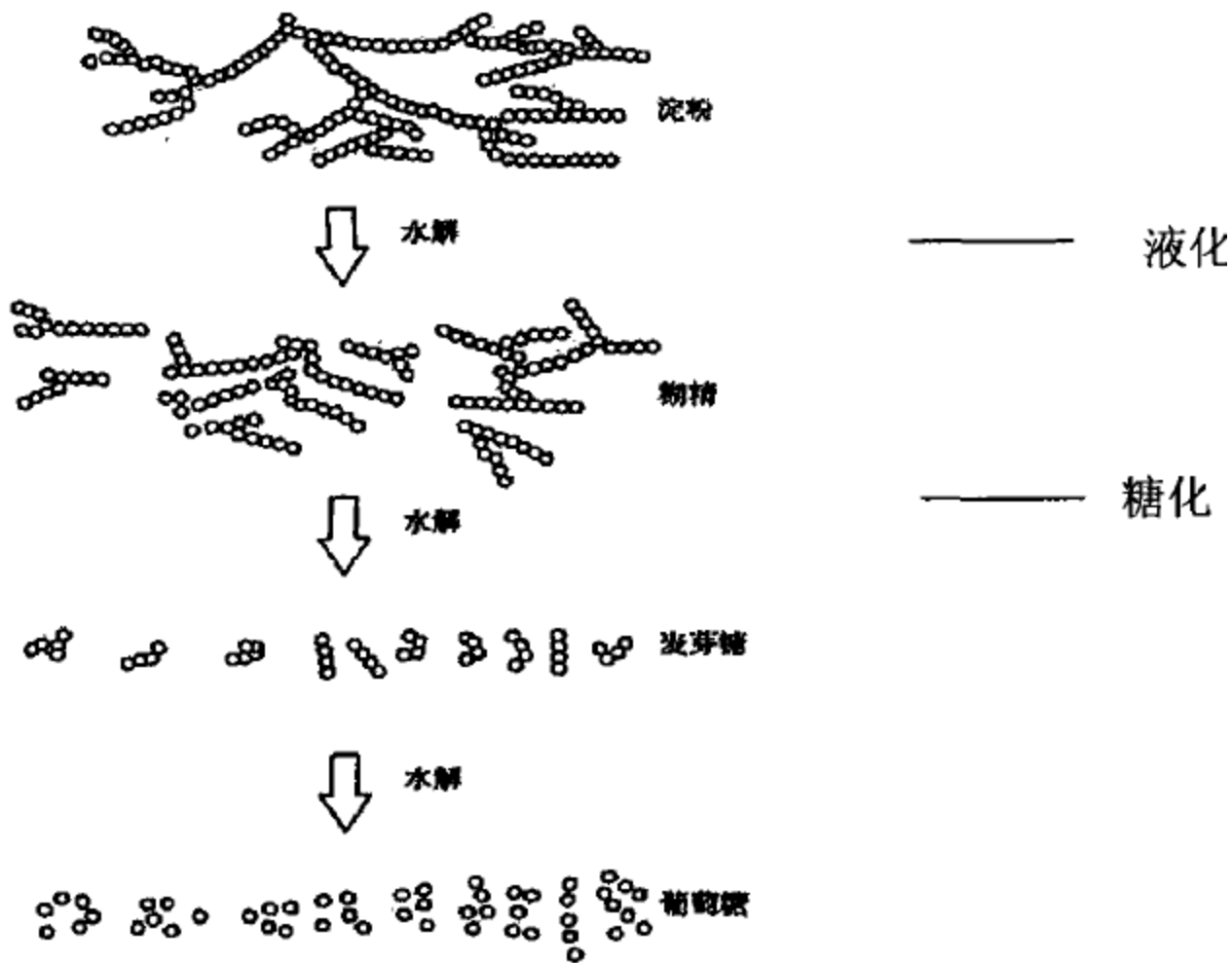


图 2: 淀粉水解过程

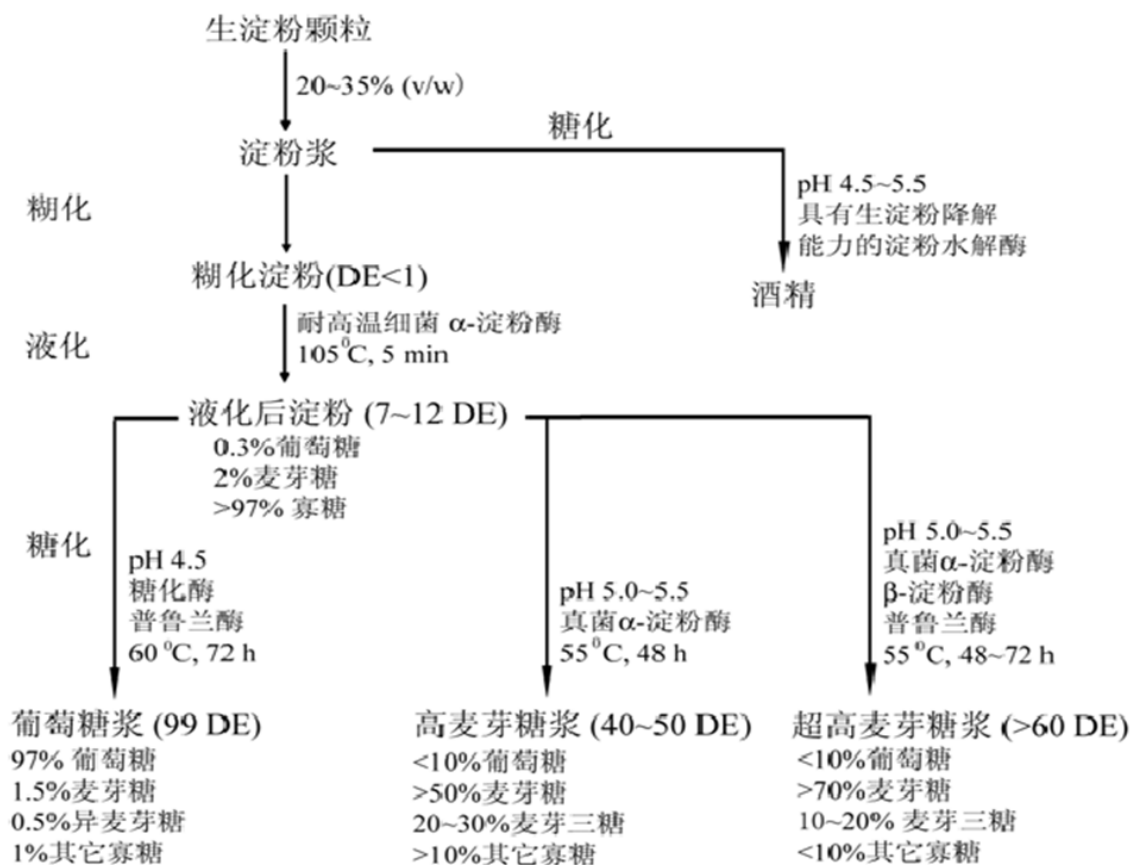


图 1-8 不同 α -淀粉酶在淀粉加工过程中的应用

Fig. 1-8 The application of α -amylases in the processing of starch

要求	量化	1 对现有 α -淀粉酶的改性
1 高温 <div data-bbox="222 696 614 825" style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> 解决方案 </div>	105° 或更高? 	<p>110°C喷射液化能使绝大部分淀粉糊化分解，但是仍有少量的淀粉颗粒需要在更高的温度下才能破裂，有些存在于细胞内的淀粉需要在135°C以上，细胞壁破裂后才能释放，另外高温还有利于蛋白质的进一步凝集。采用更高的液化温度有利于提高淀粉的利用率，更重要的是能提高糖液质量，更好适应对糖液质量要求高的工</p>
2 低最适pH和更好的酸稳定性	最适pH在4.5左右	<div data-bbox="834 1001 1690 1190" style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> 2从微生物中寻找新的α-淀粉酶。 </div>
3低或无钙离子依赖。		减少环节，降低成本，避免污染。

表 4: 商业化的 α -淀粉酶制剂的性质和用途对比Table 4 Comparison of characterization and application among commercial α -amylases

类型	酶学性质	应用
耐高温 α -淀粉酶	稳定 pH5.0-10.0, 有效 pH5.0-8.0, 最适 pH5.5-7.0, 最佳 pH6.0-6.2; 最适作用温度范围 95-105 $^{\circ}$ C, 最佳温度 100 $^{\circ}$ C。不耐酸, 在酸性条件 (pH <5.0) 时, 活性较低, 在室温-50 $^{\circ}$ C, 活性较低, 高温条件下 (>100 $^{\circ}$ C) 活性丧失快, 一般需要 Ca^{2+} 。	应用历史早, 产量大, 应用在淀粉糖生产、味精生产、啤酒和酒精生产中辅料的加工、织物退浆、以及其它酿造、有机酸和医药行业。
高效耐高温 α -淀粉酶	最适 pH 范围 5.0-7.0, 最佳 pH 范围 6.0-6.2; 最佳温度 105 $^{\circ}$ C, 最适作用温度 95-110 $^{\circ}$ C。相对一般的耐高温 α -淀粉酶, 具有高比活性, 高热稳定性, 较宽的最适 pH 范围, 低 pH 稳定性提高, 对 Ca^{2+} 需要浓度低的特点。对不同来源的原料, 即使淀粉含量很低, 也能有很好的降解效果。	能够替代一般的耐高温 α -淀粉酶。
碱性 α -淀粉酶	稳定性极好, 在 pH7-10 范围内, 特别是当 pH 超过 10 时, 仍能表现出活性, 最适 pH 范围 5.0-8.5, 易于保存不易失活。最适温度在 60 $^{\circ}$ C 左右, 在 20-100 $^{\circ}$ C 范围内, 都能表现出活性。	洗涤剂
中温 α -淀粉酶	在 60 $^{\circ}$ C 以下较稳定, 最适作用温度 60-70 $^{\circ}$ C, 90 $^{\circ}$ C 以上时失活很快; 在 pH6.0-7.0 较稳定, 最适作用 pH6.0, pH5.0 以下失活很严重。	淀粉糖生产、味精生产、啤酒和酒精生产中辅料的加工、织物退浆、以及其它酿造、有机酸和医药行业。
耐酸性 α -淀粉酶	有中温型和耐高温型两种, 最适 pH 范围 pH4.0-5.5, 在酸性条件下 pH3.5-7.0 稳定性较好, 但是可用 pH 范围差别较大。	尚处于开发阶段, 商品化的较少。可能应用淀粉糖工业、酿酒及其它发酵行业。

二、生物信息分析策略

- 1、alpha-amylase蛋白序列的获取和信息
- 2、alpha-amylase三级结构的预测和功能位点的分析
- 3、信号肽跨膜结构域的分析
- 4、家族基因的系统发育

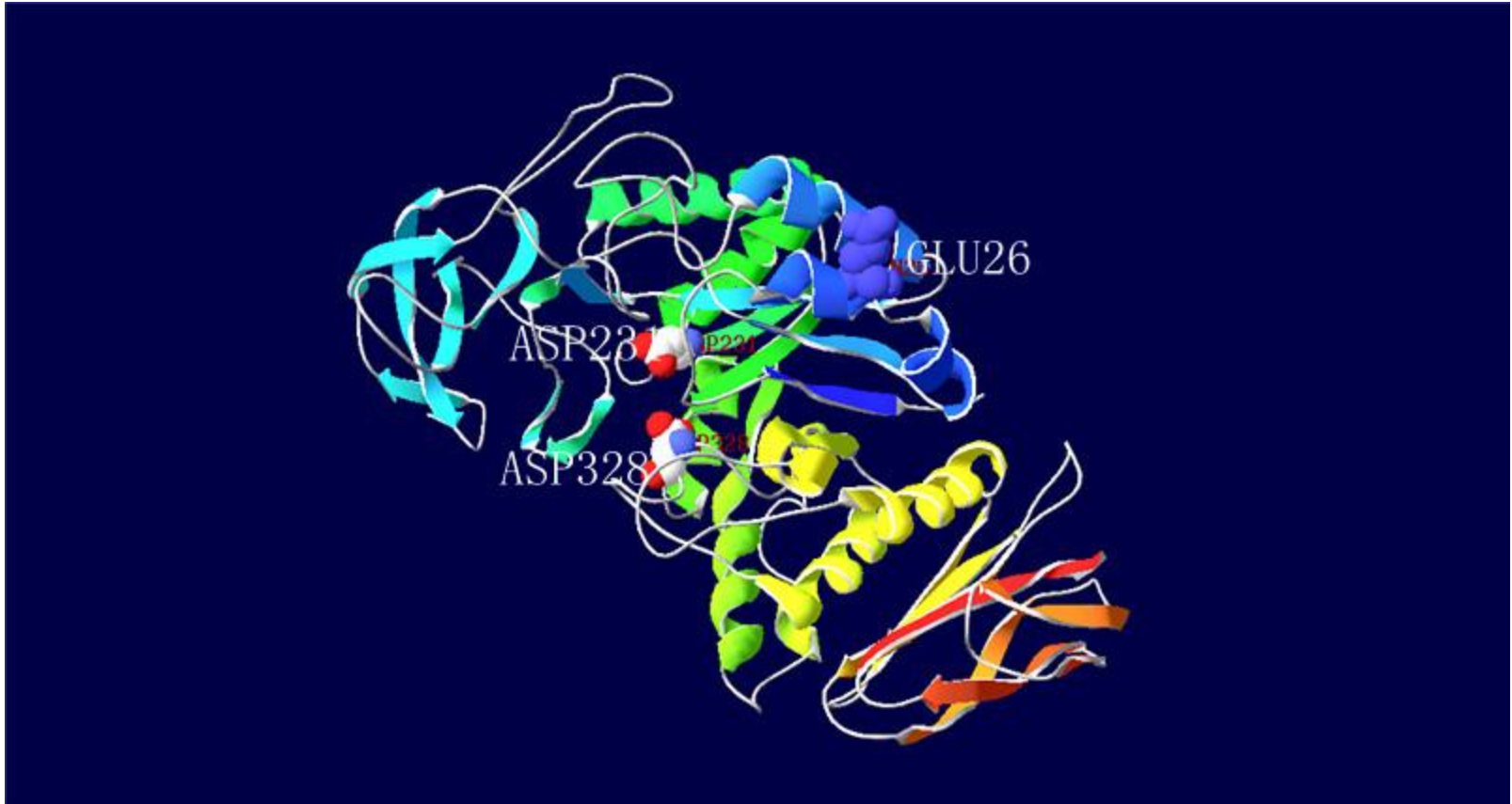
目的：推测高温淀粉酶和中温淀粉酶是否影响酶活性的差异位点。

1、alpha-amy蛋白序列的获取和信息

- 基因来源：Bacillus licheniformis
- 登录号：P06278
- 基因大小：512个aa
- 氨基酸序列：

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAAAAANLNGTLMQYFEWYMPNDG
QHWKRLQNDSAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYDLYDLGEF
HQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKG GADATEDVT
AVEVDPADRNRVISGEHRIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGT
DWDESRKLNRIYKFQ GKAWDWEVSNENGN YDYL MYADIDYDHPDVA
AEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNHVREKTGKEMF
TVAEYWQNDLGALENYLNKTN FNHSVFDVPLHYQFHA ASTQGGGYD
MRKLLNSTVVS KHPLKAVTFVDNHDTQPGQSLESTVQ TWFKPLAYAFIL
TRESGYPQV FYGDMYGTKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH DY
FDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGP GGAKRMYVGRQNAGET
WHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

2、 alpha-amy 三级结构的预测和功能位点的分析



• α -淀粉酶的结构和催化性质

- 对细菌 α -淀粉酶 X 光衍射研究表明，细菌来源的 α -淀粉酶都具有相对保守的结构特征，含有 3 个结构域 A、B、C。
- 结构域 A 由 $(\alpha/\beta)_8$ TIM 桶状结构、N 端和活性位点组成，具有酶催化反应活性中心区域（图 1-2 绿色）。
- 结构域 B 由不规则 β 片层结构组成，结构上具有高度变异性，主要是底物结合区域，决定不同底物结合的特异性（图 1-2 紫红色）。
- 结构域 C 在结构域 A 的外面，含有 C 端（图 1-2 蓝绿色）。希腊钥匙结构。
- 大部分已知的 α -淀粉酶在结构域 A 和 B 之间都含有保守的 Ca^{2+} ，对于酶的稳定性和活性起重要作用。

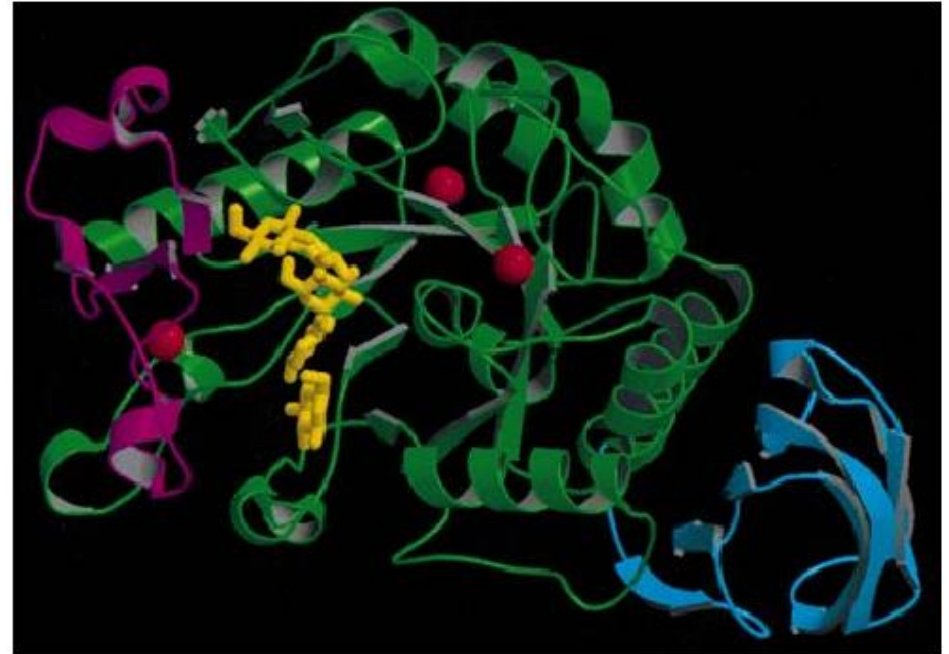


图 1-2 α -淀粉酶的三维结构模型^[5]

MacGregor EA, Janecek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1546:1-20

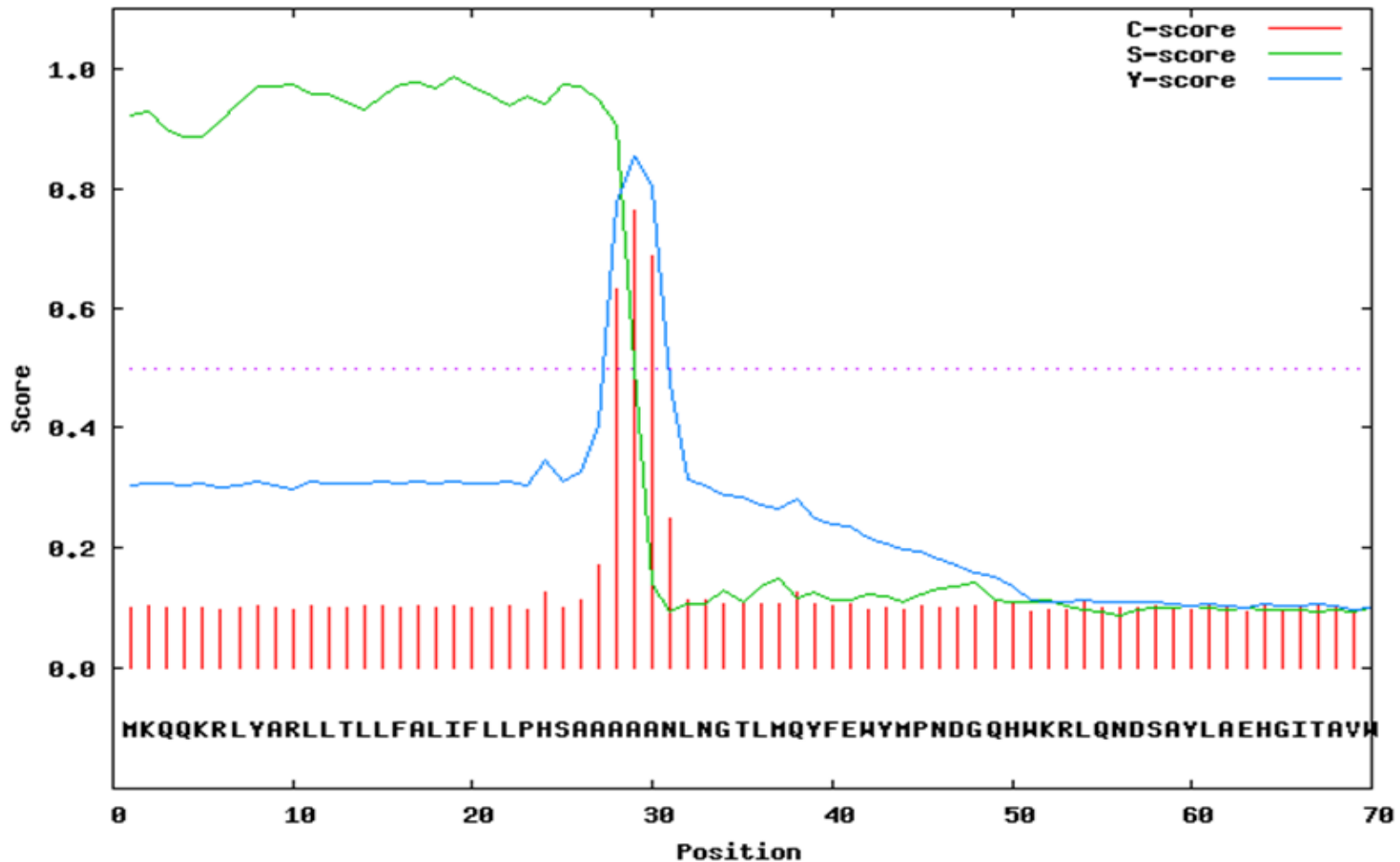
- 根据目前得到的研究结果，认为结构域C不决定 α -淀粉酶的催化专一性，但能影响 α -淀粉酶的比活

表 11: C-端部分氨基酸缺失对 α -淀粉酶 BSTA 功能的影响
 Table 11 Effect of removal of C-terminal parts on α -amylase BSTA

	野生型	突变体			
肽链氨基酸数	515	422	468	483	498
缺失氨基酸数	---	32	47	73	93
比活 U/mg	7190	no	no	2583	7018
K_m	1.09	no	no	0.35	0.21

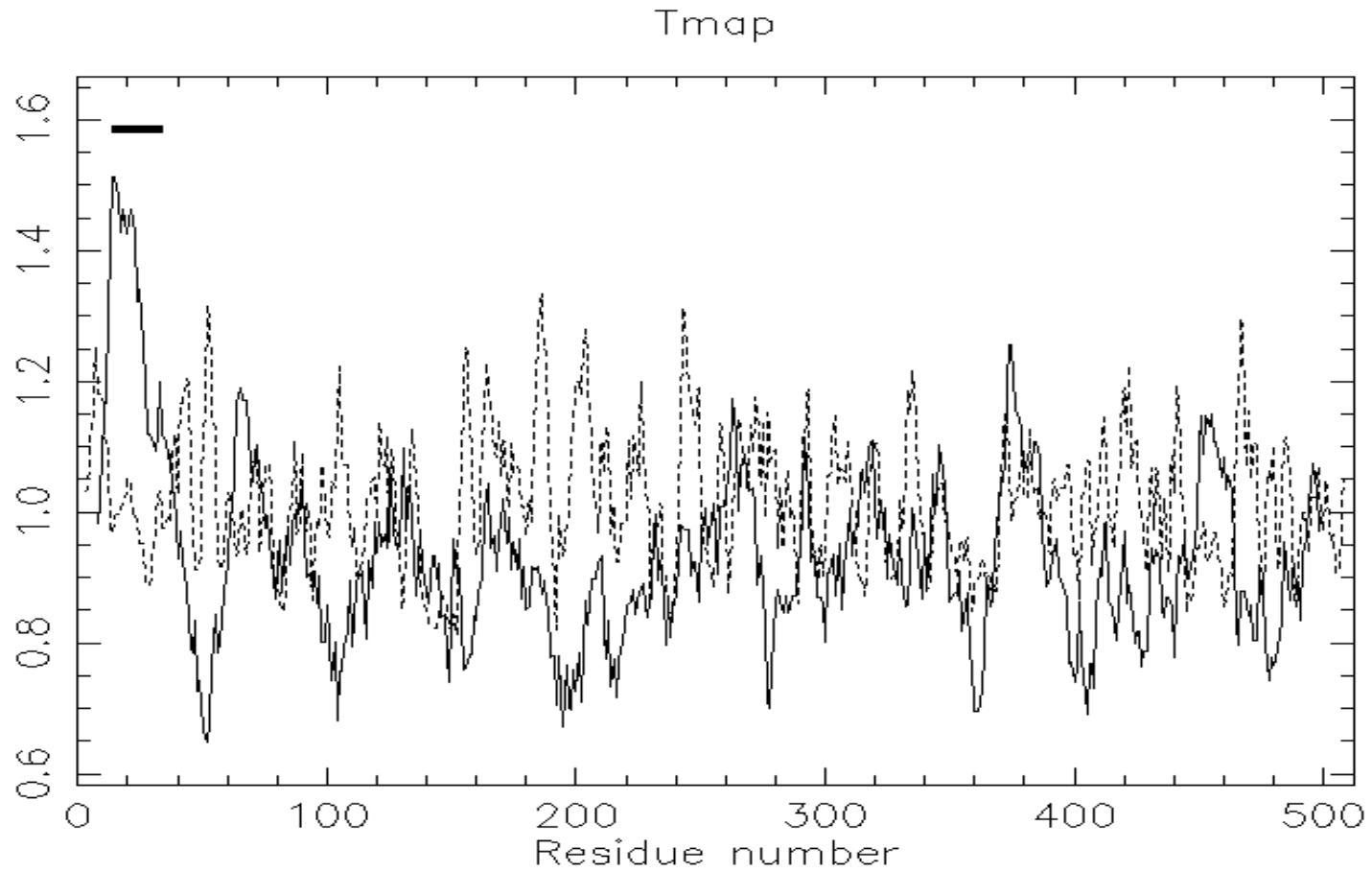
3、信号肽和跨膜结构预测

信号肽预测



SP='YES' Cleavage site between pos. 28 and 29: AAA-AA

跨膜预测

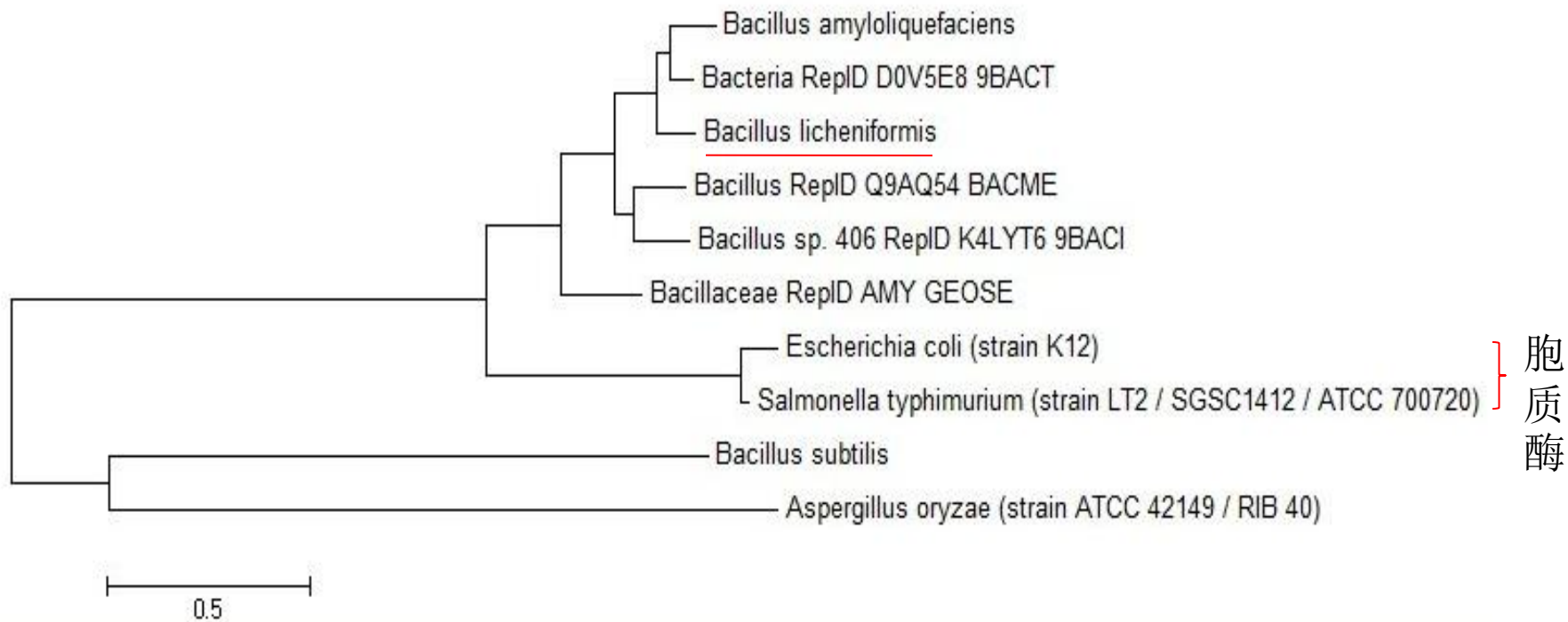


4、家族基因的系统发育

四个高温淀粉酶序列比对结果

Protein Sequences	
Species/Abb*	
BLA ← 1. sp P0627	...K...L...A...L...L...L...F...A...L...F...L...L...S...A...A...A...A...L...G...L...M...Y...F...E...Y...M...P...I...G...H...K...L...L...D...A...Y...L...A...E...G...I...A...V...I...P...A...Y...K...G...I...S...A...V...G...Y...G...A...Y...D...L...L...G...E...F...H...G...V...L...A...Y...G...T...G...I...
BSA ← 2. tr B8Y1H	...M...F...A...F...T...L...L...L...F...A...C...F...L...L...L...F...L...V...L...A...G...P...A...A...A...A...E...T...A...K...S...E...L...T...A...P...I...K...G...I...L...A...N...N...S...F...I...L...E...R...M...D...I...H...A...G...V...T...A...I...G...T...L...I...V...E...G...L...G...K...S...M...S...V...W...L...Y...H...T...S...Y...I...L...L...
米曲霉 ← 3. sp POC1B	...M...M...V...A...S...L...F...L...G...L...V...A...A...A...L...A...A...P...A...I...P...S...I...Y...F...L...L...L...F...A...F...G...T...L...A...Q...A...A...K...Y...G...G...T...G...I...D...L...L...Y...I...G...M...G...F...A...I...I...V...A...L...L...L...A...Y...G...L...A...V...G...Y...L...I...V...I...L...L...
BAA ← 4. sp P0069	...M...I...K...K...K...V...E...L...V...L...M...L...L...E...V...L...I...I...S...A...V...G...L...M...Y...F...E...Y...P...I...G...H...K...L...L...D...A...E...L...L...I...G...I...A...V...I...P...A...Y...K...G...I...S...A...V...G...Y...G...Y...D...L...L...G...E...F...H...G...V...L...A...Y...G...T...G...I...

系统发育树



• 现有对 α -淀粉酶耐热耐酸机理的研究

- Suzuki等研究发现Glu178附近和255-270两个区域对BLA的热稳定性起关键作用。Conrad等的研究则发现了四个重要区域:34-76, 112-142, 174-179和263-276, 其中两个区域与Suzuki等的研究一致。
- 对构建热稳定性更高的BLA突变株最有直接贡献的可能是Declerck等和Joyet等的研究结果。通过十多年的研究, Deelerck等人共构建了500多株BLA单个或多个氨基酸发生突变的菌株。结合蛋白质结构进行突变分析, 发现了一些有意思的规律。
 - 1 如把钙离子结合位点的氨基酸替换掉会使蛋白质的稳定性大大降低;
 - 2 热稳定性的提高并不一定意味着酶的活性会降低;
 - 3 性能的改变往往具有累积效应, 但并非所有情况下都是。
- 具体的点突变效果见表1.1。

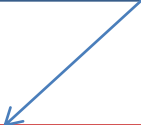
Suzuki Y, Ito N, Yuuki T et.al. Amino acid residues stabilizing a Bacillus α -amylase against irreversible thermoinactivation. *J Biol Chem*, 1989, 264(32):18933—18938.

Conrad B, Hoang V, Polley A, et al. Hybrid Bacillus amyloliquefaciens X Bacillus Licheniformis α -amylases. Construction, properties and sequence determinants. *Eur J Biochem*, 1995, 230(2):481—490.

表 1.1 改进 BLA 性能的突变

突变	效果	文献
H133Y	稳定性提高	[19]
H133I	稳定性提高	[24]
N190F	稳定性提高	[10,16]
A209V	稳定性提高	[20]
H133Y+A209V	稳定性提高	[20]
Q264S+N265Y	稳定性提高	[10,16]
H133I+N190F+A209V+Q264S+N265Y	稳定性提高	[23]
H133I+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+N265Y	稳定性提高	[23]
H156Y+A209V+A181T	稳定性提高, 低 Ca^{2+} 依赖	[10,25]
A209V+H156Y+A181T+Q264S+N190F	稳定性提高, 低 Ca^{2+} 依赖	[10,25]
N104D	适应低 pH 条件	[26]
R437L+Y439F	适应低 pH 条件	[27]
R437W		
Y439F	适应低 pH 条件	[27]

比野生的BLA提升了23°



在pH4.5酶活明显高于野生型BLA

遇到的问题

- 在蛋白质数据库里没有搜到足够的高温淀粉酶和中温淀粉酶的序列，从而无法比对这两种淀粉酶序列特有位点的差异？

三、实验方案

- 本研究将利用定点突变，饱和突变，蛋白模块重组和基于保守区的分子重排获得我们所需的基因材料，再将目的基因利用已经建立或已发表的遗传转化方法将他们转化到3种芽孢杆菌，通过酶活测定，性质评估，反馈做进一步分子改良，最终得到能够实现高效表达耐酸高温 α -淀粉酶的生产菌株。

谢谢大家！