

粘质沙雷氏菌PL-06磷脂酶A1在大肠杆菌中的分泌表达及其条件优化

陈环^{1,2}, 薛正莲^{1,2,*}, 王洲^{1,2}, 张爽^{1,2}, 苏燕南¹, 胡艳瑾¹

(1. 安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000;

2. 微生物发酵安徽省工程技术研究中心, 安徽芜湖 241000)

摘要:克隆粘质沙雷氏菌PL-06磷脂酶A1基因 $plaA$,与载体pET-22b(+)连接构建重组质粒pET-22b(+)- $plaA$,并将重组质粒导入受体菌 $E.coli$ BL21(DE3)中表达,构建得到重组菌AP22,IPTG诱导表达目的蛋白后将培养基蛋白进行SDS-PAGE分析显示:重组蛋白以可溶性蛋白的形式大量存在于发酵液中,分子质量约35 ku,与预期蛋白大小一致。以磷脂酶A1酶活为指标,在单因素实验的基础之上,通过正交实验得到摇瓶培养最佳条件为:氨苄青霉素终浓度30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,IPTG加量0.25 mmol/L,温度为34 $^{\circ}\text{C}$, OD_{600} 值为0.3,诱导时间4 h。在此条件下重组胞外磷脂酶A1酶活可高达8.6 U/mL,比优化前提高了43.3%。

关键词:磷脂酶A1,粘质沙雷氏菌,分泌表达,优化

Secretive expression and optimized condition of phospholipase A1 gene from *Serratia marcescens* PL-06 in *Escherichia coli*

CHEN Huan^{1,2}, XUE Zheng-lian^{1,2,*}, WANG Zhou^{1,2}, ZHANG Shuang^{1,2}, SU Yan-nan¹, HU Yan-jin¹

(1. Institute of Biologic, Chemical Engineering of Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2. Microorganism Fermentation Engineering and Technology Research Center of Anhui Province, Wuhu 241000, China)

Abstract: The phospholipase A1 gene from *Serratia marcescens* PL-06 named $plaA$ was cloned, ligated with pET-22b(+) to construct recombinant plasmid pET-22b(+)- $plaA$ and then transferred to $E.coli$ BL21(DE3). The engineered strains expressing phospholipase A1 was obtained, and named AP22. After subsequent induction by IPTG, lots of approximately 35 ku protein was detected in the fermented liquid by SDS-PAGE. This protein was in the same size with the expected protein. Selecting phospholipase A1 enzyme activity as reference, by single factor and orthogonal experiment method, optimized induction conditions for phospholipase A1 expression were obtained as follows: ampicillin concentration 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IPTG concentration 0.25 mmol/mL, inducing temperature 34 $^{\circ}\text{C}$, strain density OD_{600} 0.3 and induction time 4 h. Under the optimized conditions, maximum phospholipase A1 enzyme activity was observed to be 8.6 U/mL and increased by 43.3% than before.

Key words: phospholipase A1; *Serratia marcescens*; secretory expression; optimization

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)16-0193-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.16.031

磷脂酶A1广泛存在于动植物和微生物中,能催化磷脂第一位酯键的水解,生成溶血磷脂和脂肪酸。磷脂酶A1在工业上主要用于食品和非食品的磷脂乳化剂的修饰,增加油水混合物的乳化以及植物油脱胶等^[1-3]。由于磷脂酶A1广泛的工业用途,对其的研究日益广泛^[4]。微生物来源的磷脂酶A1有生产周期短、结构简单、易于工业化规模培养等优点,但野生菌株产量低、分离纯化困难,而且在食品安全方面存在一定的隐患^[5-6]。近年来关于磷脂酶A1产生菌的研

究表明产磷脂酶A1的细菌种类较多,如蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),居泉沙雷氏菌(*Serratia fonticola*),荧光假单胞菌和灰色链霉菌等^[7-10]。

随着生物工程相关技术的发展,基因克隆表达成为提高磷脂酶A1酶活的有效方式,如Fu等^[11]克隆得到一个嗜冷细菌沙雷氏菌的磷脂酶A1基因,并实现了在大肠杆菌和毕赤酵母中的表达,Michael Givskov等^[12]将克隆得到的液化沙雷氏菌(*S. liquefaciens*)磷脂酶A1基因在大肠杆菌体内进行表达,最终酶活不

收稿日期: 2014-11-18

作者简介: 陈环(1989-),女,在读硕士研究生,研究方向:粘质沙雷氏菌磷脂酶A1表达系统的优化,E-mail: chenhuang0206@126.com。

* 通讯作者: 薛正莲(1967-),女,硕士,教授,研究方向:工业微生物育种及发酵过程控制、酶的生产及应用、微生物制药等,E-mail: xuezl@ahpu.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金(C200504);安徽省自然科学基金(11040606M81)。

表1 *plaA* 基因扩增引物序列Table 1 Gene sequence of primer for *plaA* gene amplification

基因	上游引物	下游引物
<i>plaA</i>	CGCGGATCCTATGGGCAGTATGCCT	CCCGAATTCTCAGGCATTGGCCTTCG

注:下划部分分别为BamH I和EcoI I酶切位点。

到1 U/mL,而来自沙雷氏菌MK1的磷脂酶A1基因在大肠杆菌中表达时,经条件优化后酶表达量最高为2.21 $\mu\text{g}/100\text{m}$ 培养基^[13],苏燕楠等^[14]将克隆得到的粘质沙雷氏菌PL-06磷脂酶A1基因*plaA*与载体pET28a连接,导入大肠杆菌BL21(DE3)表达,发酵液酶活仅为0.8 U/mL,主要得到无活性的包涵体,胞外可溶性表达量低。为了得到高活性、高可溶性表达的磷脂酶A1,本文采用分子生物学手段,从前期筛选到的一株产磷脂酶A1菌株粘质沙雷氏菌pL-06着手,克隆磷脂酶A1基因*plaA*,与分泌型质粒pET-22b连接,成功构建AP22菌株,并对其诱导分泌条件进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大肠杆菌JM109、粘质沙雷氏菌pL-06 为本实验室筛选的高产磷脂酶A1菌株;BL21(DE3)菌株、表达载体pET-22b(+)(含氨苄青霉素抗性标记和pBR322复制位点,并含有T7、lacI启动子和T7终止子,可进行IPTG诱导) 均为本实验室保存;DNA标准Marker、T4 DNA连接酶、限制性内切酶 购自MBI公司;分子生物学相关试剂盒和试剂 均购自生工生物(上海)股份有限公司;其他化学药品 均为国产分析纯。

MG96G PCR仪 杭州朗基科学仪器有限公司;高速匀浆机 上海弗鲁克流体机械制造有限公司;自动凝胶成像系统 SYNGENE公司;JY92-2D超声波细胞粉碎机 宁波新芝科器研究所;全自动高压灭菌锅 华粤行仪器有限公司;PHSJ-3F pH计 上海精密科学仪器有限公司;数显恒温水浴锅 金坛市杰瑞尔电器有限公司。

1.2 培养基与试剂

Luria-Bertani培养基:胰蛋白胨10 g, NaCl 10 g, 酵母粉5 g, 蒸馏水1000 mL, pH7.0。

氨苄青霉素(Amp): 储液浓度50 mg/mL, 工作浓度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PLB培养基(卵磷脂+Luria-Bertani): 卵磷脂20 g, 胰蛋白胨10 g, NaCl 10 g, 酵母粉5 g, 0.02% 溴甲酚紫30 mL, 蒸馏水1000 mL, pH7.0。卵磷脂加少量Tween80用高速匀浆机乳化后单独灭菌。PB缓冲液: pH6.0 0.05 mol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液。

1.3 磷脂酶A1酶活测定

参照国标GB/T 23535-2009^[15]。酶活力定义为:1 g 固体酶粉(或1 mL液体酶),在45 $^{\circ}\text{C}$ 和pH6.0条件下,1 min水解磷脂产生1 μmol 的可滴定脂肪酸,即为1个酶活力单位(U/g或U/mL)。

1.4 磷脂酶A1基因的克隆与表达

以菌粘质沙雷氏菌PL-06基因组DNA为模板,用Primer Premier 5.0设计引物扩增磷脂酶A1基因(*plaA*)。将扩增得到的磷脂酶A1基因*plaA*经EcoI I和BamH I双酶切后与同样双酶切的pET22b(+)质粒连接,然后

转入大肠杆菌JM109感受态细胞中,在含有氨苄抗性的平板上初筛,挑取转化子进行菌落PCR,挑取菌落PCR正确的转化子提取质粒,然后双酶切验证重组质粒并送生工生物(上海)股份有限公司测序,引物序列见表1。测序成功后转化至大肠杆菌BL21(DE3),构建工程菌AP22,涂布于含有氨苄青霉素的PLB培养基,根据是否有水解晕圈筛选阳性克隆。

1.5 重组菌诱导酶活的初步测定及SDS-PAGE凝胶电泳检测

挑取AP22单克隆接种至5 mL LB/Amp液体培养基中200 r/min过夜培养,按2%接种量转接至100 mL LB/Amp液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min振荡培养至OD₆₀₀值为0.8时,加入终浓度为0.2 mmol/L IPTG继续培养4 h。诱导结束后分别对发酵液、发酵上清和破碎菌体进行酶活测定,并用SDS-PAGE检测目的蛋白在大肠杆菌中的表达。诱导结束后取样制备蛋白质样品,制备方法参照文献[16]。

1.6 重组菌株生长曲线的测定

从平板上挑取AP22、P22[pET-22b(+)/BL21(DE3)]单菌落接种于装有5 mL LB液体培养基的培养管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min过夜培养,按2%的接种量转接于装有100 mL LB液体培养基的250 mL三角瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min振荡培养,待菌体OD值生长至0.8时加入IPTG诱导并开始计时,每隔1 h取样测OD₆₀₀值。以时间为横坐标做该重组菌的生长曲线。

1.7 AP22诱导产酶条件的单因素实验

接2 mL过夜活化的AP22菌液至100 mL LB培养基中,分别从诱导时间、诱导温度,加入IPTG时的OD值、IPTG加量和氨苄青霉素(Amp)浓度五个方面通过改变单因子的方法进行诱导优化AP22产酶条件。诱导时间分别为:2、4、6、8、10、12 h;诱导温度分别为:25、30、37、42 $^{\circ}\text{C}$;加入IPTG时的OD值分别为:0.2、0.5、0.8、1.0、1.2;IPTG加量分别为:0、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、0.7、1.0 mmol/L;Amp加量分别为:10、25、50、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$;诱导结束后进行酶活定量测定。参照文献[13]初步选定在氨苄青霉素终浓度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,IPTG加量0.2 mmol/L,温度为37 $^{\circ}\text{C}$,OD₆₀₀值为0.8条件下开始进行单因素优化。

1.8 AP22诱导产酶条件的正交实验

表2 正交实验因素水平表

Table 2 Factors and levels for orthogonal array design

水平	因素			
	A Amp($\mu\text{g}/\text{mL}$)	B IPTG(mmol/L)	C 温度($^{\circ}\text{C}$)	D OD值
1	30	0.15	27	0.3
2	50	0.2	30	0.5
3	70	0.25	34	0.7

从以上单因素实验结果可以看出, 氨基青霉素 (Amp) 终浓度, IPTG 加量, 诱导温度, 加入 IPTG 时的 OD 值四个因素对磷脂酶 A1 酶活影响较大, 因此正交实验设计了四因素三水平对磷脂酶 A1 产酶条件进一步优化。4 个因素分别记做 A、B、C、D, 各因素均取 3 个水平, 设计 $L_9(3^4)$ 正交实验。因素水平见表 2。

1.9 验证实验

按照正交实验得出的最佳诱导条件进行 3 次验证实验。

1.10 数据处理

本文数据处理采用 Origin 8.0, 方差分析使用软件 SPSS 18.0。

2 结果与讨论

2.1 磷脂酶 A1 基因的扩增

用设计的引物扩增磷脂酶 A1 基因, 琼脂糖凝胶电泳表明在约 1000 bp 处有明显的条带如图 1 (a) 所示。将扩增产物及原核表达载体 pET-22b (+) 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接反应, 构建 pET-22b-*plaA* 重组质粒并转入大肠杆菌 JM109 中。构建的重组质粒经双酶切验证, 结果如图 1 (c) 所示。DNA 测序鉴定结果与 NCBI 公布的磷脂酶 A1 基因序列 (genbank 登录号: JX138535) 比对, 结果显示该片段序列完整且阅读框正确, 表明原核表达载体 pET22b (+)-*plaA* 构建成功。将构建成功后的表达载体 pET22b (+)-*plaA* 转化至表达宿主菌 BL21 (DE3), 结果如图 1 (b) 所示, 挑取有水解圈的菌落即为阳性克隆。

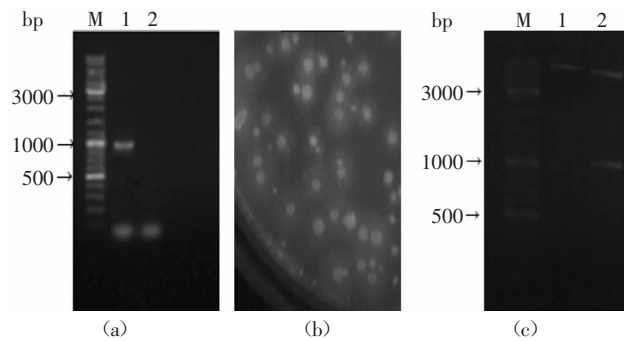


图1 目的基因扩增结果、重组菌的筛选和 *plaA*-pET-22b (+) 双酶切验证图

Fig.1 PCR amplification of the target gene, Screening of recombinant stains and Double digest analysis of *plaA*-pET-22b (+)

注: a: M: DNA 标准分子量; 1: 磷脂酶 A1 基因 PCR; 2: PCR 阴性对照; b: 重组阳性克隆筛选; c: M: DNA 标准分子量; 1: pET-22b (+) 质粒; 2: *plaA*-pET-22b (+) 质粒双酶切。

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将验证正确的重组质粒 *plaA*-pET-22b (+) 转化至感受态表达菌株 BL21 (DE3) 中, 按上述 1.5 节方法进行诱导及 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果如图 2 所示, 在发酵液、细胞破碎上清和破碎沉淀中均有特异性条带, 因此构建的重组菌 *plaA*-pET-22b (+)/BL21 (DE3) 成功表达了分子质量为 35 ku 重组蛋白, 与预期值相符, 说明磷脂酶 A1 基因 *plaA* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中得以表达。

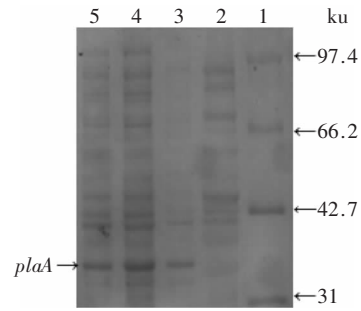


图2 大肠杆菌重组磷脂酶 A1 的 SDS-PAGE 电泳

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombination *plaA*

注: 1. 蛋白质标准分子量; 2. 阴性对照; 3. 细胞破碎上清蛋白; 4. 细胞破碎菌体蛋白; 5. 发酵上清蛋白。

2.3 AP22 诱导酶活的测定

如表 3 所示, 重组菌酶活主要在发酵液中, 发酵上清和破碎菌体中酶活之和基本上与发酵全酶活即发酵液酶活相等, 说明有活性的磷脂酶 A1 大量分泌到胞外, 便于后续 AP22 产酶条件的优化, 为了操作方便后续条件优化均选择发酵液作为粗酶液进行酶活测定。

表3 酶活测定

Table 3 Enzyme assay

	发酵液	发酵上清	破碎菌体
酶活 (U)	5.8±0.1	5.4±0.1	0.6±0.2

2.4 重组菌株生长曲线的测定

如图 3 所示, AP22 和 P22 生长情况基本一致, 而在 AP22 中加入 IPTG 后生长受到了抑制, 可以认为基因 *plaA* 本身对重组菌的生长没有影响, 但是经过 IPTG 诱导后生长受到抑制, 一方面可能是 IPTG 本身有毒性, 对菌体生长也有一定程度毒害作用, 另一方面可能是由于磷脂酶 A1 对宿主细菌的毒性, 磷脂酶 A1 的高活性表达对于宿主菌往往是致命的, 会导致其菌体自溶导致菌体生长变慢^[7]。

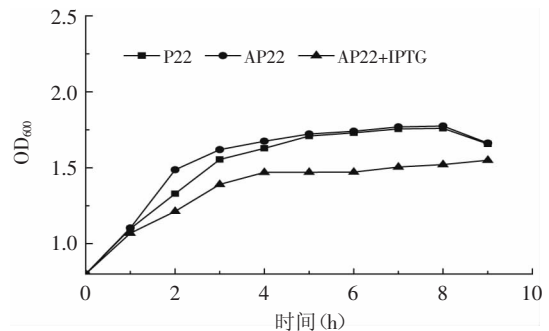


图3 重组菌生长曲线

Fig.3 Growth curve of recombinant strain

2.5 AP22 单因素诱导产酶条件优化

2.5.1 最佳诱导时间的确定 诱导时间的长短对外源蛋白表达量的多少有较大影响, 诱导时间过短目的产物没有充分表达, 导致表达量低, 由于 IPTG 和目的产物磷脂酶 A1 对菌体都有一定的毒害作用, 所以诱导时间过长菌体可能发生自溶^[7], 影响目的产物表达

量。因此,诱导时间对产磷脂酶A1有较大影响。按照1.7节方法进行最佳诱导时间的确定。结果如图4所示,诱导时间对酶活有一定程度的影响,随着时间的延长酶活增加,当诱导时间为4 h时酶活性最高,随后随着时间的递增而逐渐减小,因此确定最佳诱导时间为4 h。

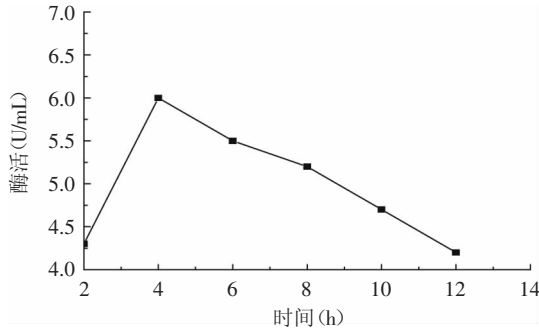


图4 诱导时间对酶活的影响

Fig.4 Effect of induction time on enzyme activity

2.5.2 最佳IPTG浓度的确定 IPTG作为诱导剂能启动lac启动子的转录,使目的基因得以表达,但是IPTG本身对细胞具有一定的毒性,对菌体生长有一定抑制作用,并且价格昂贵,所以IPTG的添加量并不是越高越好,因此,确定最佳的IPTG浓度非常重要。在最佳诱导时间条件下按照1.7节方法探讨IPTG浓度对产磷脂酶A1的影响。由图5可知,IPTG浓度对酶活影响较为明显,随着IPTG浓度的增加酶活明显提高,在IPTG浓度为0.2 mmol/L时酶活最高,随着IPTG浓度的增加反而降低,所以最佳IPTG诱导浓度为0.2 mmol/L。

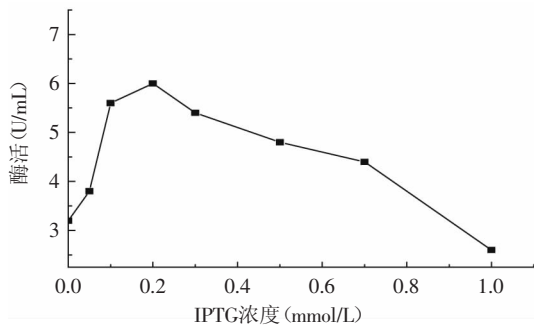


图5 IPTG浓度对酶活的影响

Fig.5 Effect of IPTG concentration on enzyme activity

2.5.3 最佳氨苄青霉素浓度的确定 随细菌培养时间的增加 β -内酰胺酶将逐渐释放到溶液中去,降解溶液中的Amp^r,不具有生长优势的表达菌又失去了选择压力,造成大部分新生细菌无质粒,表现为表达困难,由于Amp本身对细胞生长有一定抑制作用,所以Amp浓度并不是越高越好,因此合适的Amp浓度至关重要。在最佳诱导时间和IPTG浓度条件下,按照1.7节方法对Amp浓度对产磷脂酶A1的影响进行了探讨。结果如图6所示,Amp浓度对产磷脂酶A1有较大影响,当Amp浓度为50 μ g/mL时酶活最高,高于50 μ g/mL时酶活逐渐下降,因此确定最佳Amp浓度为50 μ g/mL。

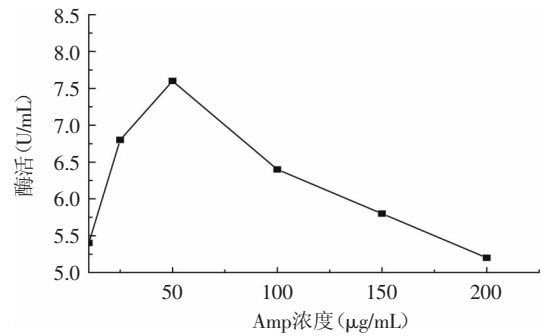


图6 Amp浓度对酶活的影响

Fig.6 Effect of Amp concentration on enzyme activity

2.5.4 最佳诱导起始OD的确定 诱导起始OD对菌体产酶有着较大影响,在对数生长期细胞代谢活性最强,细菌旺盛生长,代时最短,细胞代谢最强,体内各种酶的代谢都处于旺盛阶段,此时诱导利于外源蛋白的合成。若诱导时间过早,由于菌体量太少可能会降低外源蛋白产量;若诱导时间过迟,由于细菌过老自身代谢能力下降,所以不利于外源基因表达。在最佳诱导时间、IPTG和Amp浓度条件下,按照1.7节方法进行最佳诱导起始OD的确定。结果如图7所示,OD₆₀₀值为0.5时酶活最高,随着起始OD₆₀₀值的增加酶活明显下降,所以确定最佳诱导起始OD₆₀₀为0.5。

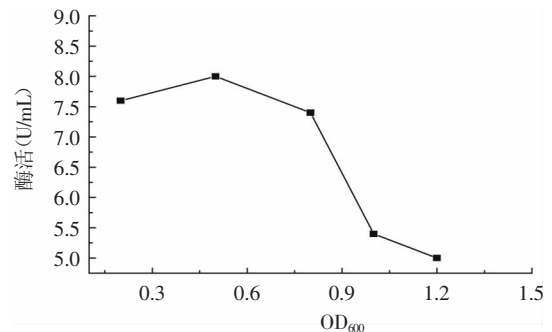


图7 诱导OD对酶活的影响

Fig.7 Effect of induction OD on enzyme activity

2.5.5 最佳诱导温度的确定 大肠杆菌的最适生长温度是37 $^{\circ}$ C,若诱导温度过高易使重组蛋白折叠错误,使目的蛋白大量以无活性的包涵体形式存在,降低胞外酶活。若温度过低会影响菌体生长,从而影响重组蛋白表达,所以诱导温度对胞外酶活至关重要。

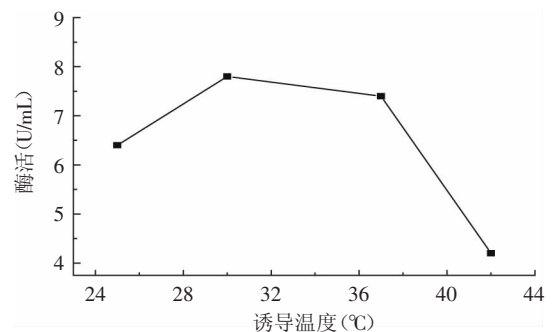


图8 诱导温度对酶活力的影响

Fig.8 Effect of induction temperature on enzyme activity

在最佳单因素条件下按照1.7节方法进行最佳诱导温度的确定。结果如图8所示,诱导温度过高严重降低了酶活,当诱导温度为30 ℃时酶活最高,诱导温度低于30 ℃时酶活也有一定程度的下降,所以确定30 ℃为最佳诱导温度。

综上所述,由单因素实验得到的重组大肠杆菌AP22诱导条件为:在含有终浓度为50 μg/mL Amp的培养基中培养至OD₆₀₀值为0.5时加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG诱导,30 ℃诱导培养4 h。

2.5.6 正交实验 表4结果说明,各因素对磷脂酶A1酶活的影响程度依次为诱导OD值(D)>诱导温度(C)>IPTG加量(B)>氨苄青霉素终浓度(A),由方差分析表5得知四因素对酶活的影响都较为显著。在实验设计范围内,确定诱导AP22得到磷脂A1酶活的最佳条件为A₁B₃C₃D₁,即抗生素浓度30 μg/mL, IPTG浓度0.25 mmol/L,温度为34 ℃,OD值为0.3,诱导时间为4 h。

表4 正交实验结果

Table 4 Results of the orthogonal test

实验号	A	B	C	D	酶活(U/mL)
1	1	1	1	1	7.1
2	1	2	2	2	6.3
3	1	3	3	3	7.3
4	2	1	2	3	5.9
5	2	2	3	1	8.1
6	2	3	1	2	5.7
7	3	1	3	2	6.3
8	3	2	1	3	5
9	3	3	2	1	8.1
K ₁	20.7	19.3	17.8	23.3	
K ₂	19.7	19.4	20.3	18.3	
K ₃	19.4	21.1	21.7	18.2	
k ₁	6.9	6.4	5.9	7.8	
k ₂	6.6	6.5	6.8	6.1	
k ₃	6.5	7.0	7.2	6.1	
R	0.4	0.6	1.3	1.7	

表5 正交实验方差分析表

Table 5 Variance analysis of orthogonal results

	平方和	自由度	均差	F值	p值
A	0.747	2	0.373	9.882	p<0.001
B	2.407	2	1.203	31.853	p<0.001
C	7.327	2	3.663	96.971	p<0.001
D	17.007	2	8.503	225.088	p<0.001

2.5.7 验证实验 按照最佳诱导优化条件,即抗生素浓度30 μg/mL, IPTG浓度0.25 mmol/L,温度为34 ℃, OD₆₀₀值为0.3,诱导时间为4 h,进行3次验证实验,得到磷脂酶A1平均酶活为8.6 U/mL。

3 结论

通过磷脂酶A1基因与pET-22b(+)载体的连接,成功实现了磷脂酶A1的原核表达,在单因素实验的基

础上进行了正交实验,得出最佳诱导条件,使重组磷脂酶A1发酵液酶活达由正交实验前的6.0 U/mL提高到8.6 U/mL,比在pET-28a(+)载体中表达2.3 U/mL^[4]的酶活提高了2.7倍,由此说明带有T7和lacI启动子的pET-22b(+)质粒具有较强的启动能力,适用于表达毒性较大的基因,并且有利于重组蛋白分泌到胞外,获得最大产量的可溶、有活性、正确折叠及可分泌到培养基中的磷脂酶A1蛋白,从而简化后续分离提纯实验,对低成本生产的微生物来源的磷脂酶A1具有重要意义,而且可为利用大肠杆菌生产分泌型重组异源蛋白提供进一步的技术措施。后续工作将利用其N端His标签进行分离纯化,获得的纯酶用于研究重组磷脂酶A1的酶学性质及一些应用。

参考文献

- [1] 李秋生,杨继国,杨博,等. 不同磷脂酶用于植物油脱胶的研究[J]. 中国油脂,2004,29(1):19-22.
- [2] 杨博,王洪建.经济环保的酶法脱胶技术[J]. 中国油脂,2004,29(3):21-23.
- [3] Kim I H, Garcia H S, Hill C G Jr. Phospholipase A1-catalyzed synthesis of phospholipids enriched in n-3polyunsaturated fatty acid residues[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40: 1130-1135.
- [4] Joshi A, Paratkar S G, Thorat B N, et al. Modification of lecithin by physical, chemical and enzymatic methods[J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2006, 108: 363-373.
- [5] Ramrakhiani L, Chand L. Recent progress on phospholipases: different sources, assay methods, industrial potential and pathogenicity[J]. Appl Biochem Biotech, 2011, 164(7):991-1022.
- [6] Studier F. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. Protein Express Purif, 2005, 41(1): 207-234.
- [7] 李军红,姜绍通,操丽丽,等. 磷脂酶产生菌株的筛选及其性质研究[J]. 食品科学,2008,29(11):418-421.
- [8] 付建红,唐辉桂,姚斌,等. 一株产低温碱性磷脂酶A1耐冷细菌的筛选及发酵条件的初步研究[J]. 工业微生物,2008,38(5):12-16.
- [9] 姜芳燕,王金梅,戴大章,等. 产磷脂酶菌株的筛选鉴定及其应用[J]. 化工学报,2012,63(3):887-893.
- [10] 赵梦梦,薛正莲,苏燕南,等. 产磷脂酶A1菌株的筛选及其发酵条件的优化[J]. 中国生物制品学杂志,2012,25(7):901-905.
- [11] Fu J H, Huang H Q, Meng K. A novel cold-adapted phospholipase A1 from *Serratia* sp.xjF1: Gene cloning, expression and characterization[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42: 187-194.
- [12] Michael G, Lars O, Soren M. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(12):5855-5862.
- [13] Song J K, Kim M K, Rhee J S. Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A1 from *Serratia* sp. MK1 in *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 1999, 72: 103-114.

(下转第202页)

因毕赤酵母工程菌,利用重组酶降解魔芋胶制备葡甘露低聚糖;与之相比,本研究采用的粟酒裂殖酵母安全可靠,可直接应用于食品生产。郭书贤^[21]、王柳玲^[22]、宋清鹏等^[23]以果汁、果肉为原料制备红茶菌,获得特殊风味和口感的红茶菌,在优化发酵工艺后,提高红茶菌的总酸。本研究在红茶菌制备工艺中添加魔芋精粉,不仅可以提高红茶菌中的总酸,还有利于增加低聚糖含量,提高红茶菌的营养价值和保健功能。

利用 β -葡聚糖酶基因酵母工程菌,研究魔芋红茶菌的发酵工艺,优化发酵条件后,获得可调配不同红茶菌饮料的高浓度有机酸红茶菌原液,提高红茶菌工业化开发的可能性。在发酵过程中,酿酒酵母为工程菌提供生长所必需的尿嘧啶,无需额外添加尿嘧啶;魔芋精粉可以增加红茶菌中多糖含量,赋予红茶菌新的口感和风味,同时提高总酸,加快代谢产物积累,缩短发酵时间;利用KGM降解与利用过程相结合的方式,提高魔芋红茶菌的营养价值,简化生产流程,降低生产成本,因此具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 罗清楠,赵国华,庞杰,等. 魔芋葡甘聚糖研究进展[J]. 食品与发酵工业,2011,37(6):137-140.
- [2] 钟燕,索化夷. 魔芋葡甘聚糖的功能及在食品领域的应用[J]. 中国酿造,2014,33(8):6-9.
- [3] 李雨露,毕海燕,惠丽娟,等. 白梨魔芋搅拌型酸奶的工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,33(20):266-268.
- [4] 侯方丽,徐金瑞,张名位,等. 卡拉胶复配凝胶特性及其在绿茶可吸果冻中的应用[J]. 食品工业科技,2013,34(18):306-310.
- [5] Paquet É, Bédard A, Lemieux S, et al. Effects of apple juice-based beverages enriched with dietary fibres and xanthan gum on the glycemic response and appetite sensations in healthy men [J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2014, 4(1):39-47.
- [6] Luz S S, De Campos P L, Ribeiro S M, et al. Current concepts of digestion and absorption of carbohydrates[J]. *Arquivos de Gastroenterologia*, 1996, 34(3):175-185.
- [7] Al-Ghazzawi F H, Khanna S, Tester R F, et al. The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2007, 87(9):1758-1766.
- [8] Chiu Y T, Stewart M. Comparison of konjac glucomannan digestibility and fermentability with other dietary fibers *in vitro* [J]. *Journal of Medicinal Food*, 2012, 15(2):120-125.
- [9] 向进乐,陈文品,刘勤晋. 魔芋低聚糖的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004(1):20-23.
- [10] 吴拥军,孟望宽. 魔芋葡甘甘露低聚糖提取及其发酵产物对耐氧双歧杆菌的促生长作用[J]. 食品工业科技,2002,23

(9):41-43.

- [11] 陈黎,杨艳燕. 魔芋低聚糖降脂作用的初步研究[J]. 中国生化药物杂志,2002,23(4):181-182.
- [12] 罗清楠,谭玉荣,刘宏,等. 响应曲面法优化酸法魔芋葡甘露聚糖水解工艺[J]. 食品科学,2012,33(6):119-122.
- [13] 姚雪,罗学刚,韩本超. 魔芋葡甘聚糖酶解过程及各种不同分子量葡甘露低聚糖制备条件的研究[J]. 食品工业科技,2011(9):97-101.
- [14] 吴月蛟,邓利玲,张志刚,等. 含魔芋胶/魔芋葡甘露低聚糖悬浮饮料的制备[J]. 食品工业科技,2012,33(15):263-266.
- [15] 贺雪蛟,王洪新,马朝阳,等. β -甘露聚糖酶低限度水解制备适度黏度魔芋胶[J]. 食品与发酵工业,2011,37(6):102-105.
- [16] 张甫生,庞杰,李文东. 魔芋饮料的加工技术[J]. 江苏食品与发酵,2002,3(2):37-38.
- [17] 倪玉佳,周旻昱,欧阳嘉,等. 黑曲霉嗜热 β -甘露聚糖酶在毕赤酵母中的克隆表达及其魔芋降解产物分析[J]. 生物技术通报,2014(6):181-185.
- [18] 宁玉洁. 纤维素降解菌中葡聚糖酶基因的克隆表达及活性[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [19] Vina I, Semjonovs P, Linde R, et al. Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(2):179-188.
- [20] Wang K, Gan X, Tang X, et al. Determination of d-saccharic acid-1,4-lactone from brewed kombucha broth by high-performance capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(3):371-374.
- [21] 郭书贤,王冬梅,王庆洁,等. 芦荟红茶菌复合发酵饮料的研制[J]. 食品科学,2007,27(12):940-945.
- [22] 王柳玲,胡卓炎,余小林,等. 荔枝果汁红茶菌发酵工艺条件的探讨[J]. 食品与发酵工业,2013,39(7):208-215.
- [23] 宋清鹏,胡卓炎,赵雷,等. 龙眼果肉发酵红茶菌饮料[J]. 食品与发酵工业,2014,40(1):216-221.
- [24] Moreno S, Klar A, Nurse P. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [J]. *Methods in Enzymology*, 1991, 194:795-823.
- [25] 王硕. 醋酸菌的分离与鉴定以及红茶菌培养的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2008.
- [26] Alfa C, Fantes P, Hyams J, et al. Experiments with fission yeast: a laboratory course manual[M]. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.
- [27] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 12456-2008食品中总酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [28] 苑丽娜,王定和,王永杰,等. 一种简便的适用于酵母双杂交系统的酵母质粒提取方法[J]. 生物技术通讯,2012,22(6):864-866.

(上接第197页)

- [14] 苏燕南,薛正莲,陈涛,等. 粘质沙雷氏菌PL-06磷脂酶A1基因大肠杆菌优化表达[J]. 中国生物工程杂志,2013,33(7):36-42.
- [15] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23535-2009, 脂肪酶制剂[S]. 北京:中国标准出版社,2009.
- [16] 刘菲菲,张梁,顾正华,等. 蜡状芽孢杆菌磷脂酶C基因在

- 大肠杆菌中的异源表达[J]. 食品科学,2013,34(11):182-187.
- [17] Richmond G S, Smith T K. Phospholipases A1[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2011, 12:588-612.
- [18] Novagen. pET System Manua[EB/OL]. 2003, TB055(10):18. www.novagen.com.