

重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的纯化及其性质

王雅洁¹, 张洪斌^{1*}, 胡雪芹¹, 朱春宝², 胡又佳²

(¹合肥工业大学制药工程系, 合肥 230009)

(²上海医药工业研究院, 上海 200040)

摘要:【目的】研究工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28-dexYG 产右旋糖酐蔗糖酶的纯化和酶学性质。

【方法】工程菌经过 IPTG 诱导后生产含 His-tag 融合蛋白的右旋糖酐蔗糖酶, 通过硫酸铵沉淀、Ni-NTA 亲和层析纯化, 得到纯度较高的酶蛋白, 并对纯酶进行了酶学性质及动力学研究。【结果】经过 SDS-PAGE 测得该酶的分子量约为 170 kDa, 与理论推测值基本相同。以蔗糖为底物, 酶促反应的最适温度为 25~30℃, 最适 pH 值为 5.4, 动力学常数 K_m 值为 10.43 mmol/L; 酶活在 pH 5.0~8.0 较为稳定, 在室温 (25℃) 保藏 4 天仍有 59% 的酶活力, 4℃ 保存 7 周酶活力仅下降一半, 但在 35℃ 以上失活很快; Ca^{2+} 对催化作用有较大的促进, Mg^{2+} 有微弱的促进作用, K^+ 对催化反应无影响, Cu^{2+} 的抑制作用最强。其他试剂对重组酶的活性有不同程度的影响, 其中 SDS 抑制作用很强。【结论】研究为重组右旋糖酐蔗糖酶纯酶的获取、得到稳定性好、活性高的酶反应体系及利用该酶进行催化反应和工业化应用提供了重要参数。

关键词: 右旋糖酐蔗糖酶; 重组大肠杆菌; 纯化; 性质

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 09-1266-04

右旋糖酐蔗糖酶 (Dextranase, EC2.4.1.5) 是一种由肠膜状明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 和链球菌属 (*Streptococcus*) 发酵产生的、属于葡萄糖基水解酶 70 家族中的一种葡萄糖基转移酶 (Glucosyltransferases), 分子量约为 160~200 kDa^[1]。该酶以蔗糖为底物, 将蔗糖分子中 D-葡萄糖基催化转移到受体分子, 其结果可以生成两种不同的产品^[2]: α -葡聚糖, 因其具有安全、无毒、生物相容性好等多种优点, 已被广泛应用于医药、食品、色谱分析等多个领域^[3]; 若在酶反应中加入受体如麦芽糖、异麦芽糖等可合成具有保健功能的低聚糖; 同时伴有果糖产生^[4]。因此, 获得纯度和活性均高的右旋糖酐蔗糖酶, 对于实现诸多实际应用具有重要意义。

由于通过肠膜状明串珠菌或链球菌发酵得到的

右旋糖酐蔗糖酶是诱导酶, 诱导物与酶底物均为蔗糖, 产生的高粘度葡聚糖与酶和细胞形成复合物, 对酶的提取纯化和催化产物的质量控制都造成很大的困难。因此, 通过基因工程菌表达分离获得稳定性好、易于纯化的右旋糖酐蔗糖酶是目前国内外研究热点之一^[5-7]。本实验室从一株 *L. mesenteroides* 中扩增出右旋糖酐蔗糖酶基因 *dexYG* (GenBank, DQ34576), 并成功构建了能高效表达重组右旋糖酐蔗糖酶的工程菌株 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28-dexYG^[8]。为了更好地应用重组右旋糖酐蔗糖酶, 本文着重对该酶的分离纯化及酶学性质进行了较为全面的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 基因工程菌 *E. coli* BL21 (DE3)/pET28-

基金项目: 安徽省高校省级自然科学研究重点项目(KJ2008A067); 合肥工业大学博士专项资助基金(GDBJ2008-021)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-551-2901968; E-mail: zhb5678@163.com

作者简介: 王雅洁(1984-), 女, 安徽岳西人, 硕士研究生, 研究方向为生物化工与酶工程。E-mail: cactus0926@ah163.com

收稿日期: 2008-03-07; 修回日期: 2008-05-15

dexYG 由本实验室构建、保存。

1.1.2 培养基: (1) 发酵培养基: 普通 LB 培养基; (2) 诱导培养基: 用 0.2 mol/L、pH 6.0 的磷酸盐缓冲液代替去离子水、其他成分与 LB 培养基相同。

1.1.3 主要试剂和仪器: 异丙基硫代- β -D 半乳糖苷 (IPTG) 和卡那霉素购自上海捷瑞; 蛋白质分子量标准购自大连 TaKaRa 公司; Ni-NTA 预装柱购自北京百汇中源生物科技公司; 其他常用试剂均为市售国产试剂。VIS-723 紫外分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); 低温冰箱 (-50) (日本 SanYo); pH 计 (上海康仪仪器); 电泳仪 (北京六一仪器厂); 恒温摇床 (武汉中科仪器厂)。

1.2 右旋糖酐蔗糖酶的表达

将基因工程菌 BL21(DE3)/pET28-dexYG 于含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 培养基中 37 、250 r/min 培养过夜 (约 16 h)。将过夜培养的菌液按照 1 % 的接种量接种到 100 mL 含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 培养基中, 37 、250 r/min 培养约 4 h 至 OD_{600} 为 1.0 时, 4 、9160 \times g 离心 10 min 弃上清液收集菌体。将菌体与已灭菌的诱导培养基 100 mL 混合均匀, 然后加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 25 、250 r/min 培养 4 h 诱导右旋糖酐蔗糖酶的表达。100 mL 发酵液 4 、9160 \times g 离心 10 min 收集菌体, 用 10 mL 含 $CaCl_2$ 0.05 g/L、0.02 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液悬浮, 冰水浴中超声 1 s, 间歇 2 s, 150 W 破碎 10 min 后, 4 、9160 \times g 离心 10 min 收集上清。

1.3 右旋糖酐蔗糖酶的纯化

1.3.1 硫酸铵粗提 (以下若无具体说明则实验操作在 0~4 进行): 粗酶液经 0.45 μ m 滤膜过滤后, 用 20% 饱和硫酸铵沉淀, 过夜放置后 9160 \times g 离心 15 min 弃沉淀, 上清液再用 50% 饱和硫酸铵沉淀, 过夜放置后 9160 \times g 离心 15 min 弃上清, 沉淀溶于含 300 mmol/L NaCl、pH 7.4、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液中。

1.3.2 镍离子螯合亲和层析纯化: 将上述溶液对 300 mmol/L NaCl、pH 7.4、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 4 过夜透析, 浓缩后加样到已平衡的床体积为 0.5 mL 的 Ni-NTA 预装柱。先用含 500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、pH 为 7.4、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液清洗柱子 3 次, 每次 5 mL。再用含有 100 mmol/L 咪唑、300 mmol/L NaCl、pH 为 7.4、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗脱非特异性吸附的蛋白 2 次, 每次 3 mL。

然后用含 250 mmol/L 咪唑、300 mmol/L NaCl、pH 为 7.4、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 4 mL 洗脱目标蛋白, 流速为 1 mL/min。收集洗脱液后经 8% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色鉴定纯化蛋白。

1.4 右旋糖酐蔗糖酶活力测定

以果糖的生成速度测定酶活性大小, 参考文献[8]。在 30 下, 1 mL 底物反应液中每小时催化底物蔗糖产生 0.1 mg 果糖所需的酶量定义为一个酶活力单位(U)。

1.5 SDS-PAGE 分析

具体步骤参照[9], 分离胶浓度为 8%, 浓缩胶浓度为 5%。

1.6 右旋糖酐蔗糖酶学性质

1.6.1 酶的最适反应 pH 值及 pH 稳定性: 在不同 pH 的反应体系中测定酶活力, 研究酶促反应的最适 pH。将酶分别置于不同 pH 的缓冲液中, 25 中放置 1 h, 测定其对应的剩余酶活力, 以酶活最高者为 100%, 研究酶的 pH 稳定性。

1.6.2 酶的最适反应温度及热稳定性: 在不同温度下测定酶活力, 考察酶的最适反应温度。将酶液在 pH 5.4、20 mmol/L 的醋酸钠缓冲液中于不同温度保温 1 h, 测定其对应的剩余酶活力, 以酶活最高者为 100%, 考察酶的温度稳定性。并将该酶在 25 和低温 4 保藏, 取样测量保藏过程中酶活的变化。

1.6.3 动力学常数 K_m 的测定: 将酶液与不同浓度的蔗糖底物作用, 测定酶反应的初速度, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出以蔗糖为底物的酶的 K_m 值。

1.6.4 金属离子和其他试剂对酶活力的影响: 在不同反应体系中分别加入各种金属离子和试剂, 测定酶活力, 以未加入的酶液做对照, 观察金属离子和试剂对酶活力的影响。

2 结果

2.1 右旋糖酐蔗糖酶的表达和纯化

经过 IPTG 诱导表达后的粗酶液活力达到 50.62 U/mL, 比酶活为 128.8 U/mg。粗酶液经硫酸铵沉淀、Ni-NTA 树脂进一步亲和层析纯化, 经 8% SDS-PAGE 检测, 考马斯亮蓝染色后显示为分子量约 170 kDa 的条带, 表 1 为纯化倍数和回收率。该重组酶有较高的生物活性, 其分离纯化比从肠膜状明串珠菌发酵液中提取纯化简便。

表 1 右旋糖酐蔗糖酶的纯化
Table 1 Purification of dextransucrase from *E. coli*.

Purification step	Total protein/mg	Total activity /U	Specific activity /(U/mg)	Purification (fold)	Yield /%
Crude extract	39.3	5062	128.8	1.0	100
(NH) ₂ SO ₄ precipitation	17.4	3574	206.1	1.6	63.6
Ni-NTA	1.29	1898	1468.3	11.4	37.5

2.2 酶学性质研究

2.2.1 酶的最适反应 pH 值及 pH 稳定性: 该酶催化合成反应的最适 pH 值为 5.4。当反应 pH 降低到 5.0 以下, 酶活下降比较快。右旋糖酐蔗糖酶的等电点在 4.0 左右, 所以当体系 pH 值接近于 4.0 的时候, 几乎无催化活力。酶的 pH 稳定性实验结果表明该酶在 pH 5.0~pH 7.0 比较稳定, 催化活力无明显变化。而酶在 pH 5.0 以下或者 pH 7.0 以上, 其稳定性差。

2.2.2 酶的最适反应温度及热稳定性: 结果得到酶的最适反应温度为 25~30, 当温度在 20 或者 35 左右, 酶活力为最高活力的 65%。酶在 25 保温 1 h 后活力没有明显的降低, 30 保温 1 h 后剩余活力为原来的 64%, 温度达到 35 保温 1 h 后酶全部失活, 表明该酶的热稳定性较差。将酶置于 25 和 4 保藏并定期取样测量酶的剩余活力, 发现酶在 25 放置 4 天后, 酶的剩余活力为原来的 59%。在 4 下, 保藏 1 周后酶活未明显下降, 保藏 2 周后剩余 77% 活力, 保藏 7 周后剩余 50% 活力。

2.2.3 动力学常数 K_m 的测定: 以 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20% 的蔗糖作为底物, 测定底物反应速率, 用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法 (图 1), 求得 K_m 值为 10.43 mmol/L。

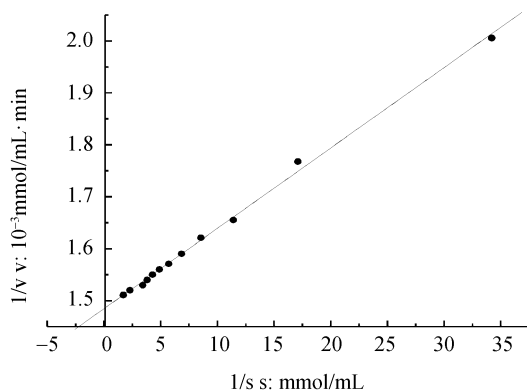


图 1 蔗糖浓度和反应速度的双倒数曲线
Fig. 1 Double reciprocal curve of velocity and sucrose concentration.

2.2.4 金属离子和其他试剂对酶活力的影响: 结果表明, 对酶活促进作用比较明显的为 Ca^{2+} , 有微弱促进

作用的为 Mg^{2+} , 对酶活影响不大的为 K^+ 。其他离子对酶催化活力有不同程度的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 对酶活有较强的抑制作用, Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 有微弱的抑制作用。1 mmol/L 的 SDS 抑制 90% 左右的活力, Tris 和 Urea 抑制 40% 左右的活力, EDTA 只有较弱的抑制作用。

表 2 金属离子和其他化合物对酶活力的影响
Table 2 Effect of some compounds and metal ions on activity

Compounds and ion	Concentration /(mmol/L)	Relative activity/%
Control	/	100.0
Ca^{2+}	0.5	150.4
	1	139.8
	2	127.0
Mg^{2+}	1	108.7
K^+	1	100.0
Mn^{2+}	1	85.4
Fe^{2+}	1	84.3
Zn^{2+}	1	93.2
Cu^{2+}	1	30.5
Co^{2+}	1	95.0
EDTA	1	82.4
SDS	1	10.5
Urea	1	61.0
Tris	1	55.6

3 讨论

工程菌经 IPTG 诱导后, 得到了具有酶活性的融合蛋白。虽然带有 N 末端的标签蛋白, 仍表现出很高的活力, 酶合成的最佳温度易于达到和控制, 有利于该酶应用于工业生产。酶合成右旋糖酐反应并不依赖于金属离子, 但是低浓度的 Ca^{2+} 有利于维持酶的构象, 可用于提高酶的活力和稳定性。 Cu^{2+} 对酶的抑制作用比较明显, 主要因为 Cu^{2+} 能直接作用于酶活性位点中的组氨酸, 与巯基形成复合物并能与咪唑环结合^[10]。由于宿主菌在发酵制备右旋糖酐蔗糖酶的过程中, 产生了高粘度葡聚糖与该酶和细胞结合, 对酶的分离纯化和发酵产物的质量控制和后处理都造成很大的困难。并且即使从发酵液中提取了天然酶, 经过纯化去除右旋糖酐后的酶活力较纯化前下降很多, 仍需要在反应初期加入少量右旋糖酐来激发酶活^[11]。该大肠杆菌所产重组酶的分离纯化步骤相对简单, 不需要右旋糖酐激活即能表现出较好的催化能

力,且发酵产物中大大减少了菌体蛋白的污染。

重组右旋糖酐蔗糖酶克隆表达的关键问题是胞内和胞外酶蛋白的折叠问题,蛋白容易相互聚集而造成酶活的部分或全部丧失,这在不同来源的右旋糖酐蔗糖酶的克隆和表达中都比较常见^[12]。蛋白质未能正确折叠不仅容易形成包涵体,而且会增强酶与细胞的结合能力,不利于酶的提取和应用。本实验室克隆表达的细胞抽提物上清中可溶性的重组蛋白酶活较高,直接超声破碎菌体即可得到粗酶液,避免了处理包涵体和酶的体外折叠等问题,使操作步骤减少。该重组右旋糖酐蔗糖酶在室温(25℃)下保存4 d后活力下降不到一半,在4℃下保存7周后剩余一半活力,在30℃放置1 h后剩余活力64.3%,与文献曾报道的除去右旋糖酐的酶在30℃放置0.6 h损失一半活力相比^[12],有明显提高。表明该异源表达的右旋糖酐蔗糖酶的稳定性较好,为其可以长时间持续发酵生产和重复利用打下基础,有利于酶的应用和开发。

参 考 文 献

- [1] Monchois V, Remaud-Simeon M, Russell RRB, et al. Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48: 465–472.
- [2] Seung HN, Eun AK, Suk SJ, et al. Maximization of dextranucrase activity expressed in *E. coli* by mutation and its functional characterization. *Biotechnol Lett*, 2008, 30: 135–143.
- [3] Berensmeier S, Ergezinger M, Bohnet M, et al. Design of immobilized dextranucrase of fluidized bed application. *J Biotechnol*, 2004, 114: 255–267.
- [4] Petronijevic Z, Ristic S, Pesic D, et al. Immobilization of dextranucrase on regenerated bezoyl cellulose carriers. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40: 763–768.
- [5] Kim D, Robyt JF. Dextranucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb Technol*, 1995, 17: 1050–1056.
- [6] Kang H, Seo E, Robyt JF, et al. Directed evolution of a dextranucrase for increased constitutive activity and the synthesis of a highly branched dextran. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 26: 167–176.
- [7] Monchois V, Willemot R, Remaud-Simeon M, et al. Cloning and sequencing of a gene coding for a novel dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 synthesizing only $\alpha(1-6)$ and $\alpha(1-3)$ linkages. *Gene*, 1996, 182: 23–32.
- [8] 张洪斌, 朱春宝, 胡又佳, 等. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(4): 492–497.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] Lencki RW, Delaire M, Tecante A, et al. Effect of ferric and cupric ions on the inactivation rate of dextranucrase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, 42(263): 263–269.
- [11] Chludzinski AM, Germaine GR, Schachtels CF. Purification and Properties of Dextranucrase from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 1974, 118(1): 1–7.
- [12] Malten M, Hollmann R, Deckwer W, et al. Production and Secretion of Recombinant *Leuconostoc mesenteroides* Dextranucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89 (2): 207–218.

Purification and characterization of recombinant *Escherichia coli* dextranucrase

Yajie Wang¹, Hongbin Zhang^{1*}, Xueqin Hu¹, Chunbao Zhu², Youjia Hu²

⁽¹⁾Department of Pharmaceutical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

⁽²⁾Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China)

Abstract: [Objective] To purify and characterize recombinant dextranucrase expressed in engineered strain BL21 (DE3)/pET28-dexYG. [Methods] The dextranucrase gene (*dexYG*) was expressed in engineered strain after IPTG induction and the crude enzyme was obtained by sonication. We purified the recombinant dextranucrase by using ammonium sulfate precipitation and metal chelate affinity chromatography on a Ni-NTA column. Then we characterized catalytic kinetic parameter of purified enzyme. [Results] This purification protocol resulted in a 11.4-fold purification with a yield of 37.5%. The molecular weight of dextranucrase measured by SDS-PAGE was 170 kDa, which was similar to the enzyme from *Leuconostoc mesenteroides*. The enzyme had an optimum temperature between 25 and 30℃ and an optimum pH of 5.4. It was relatively stable in the range of pH 5.0 to 7.0, but the stability declined rapidly as soon as the temperature rose over 35℃. The enzyme activity remained 59% after stored for 4 days at room temperature (25℃), and lost 50% activity after stored for seven weeks at 4℃. Ca^{2+} of 0.5 mmol/L could strongly activate the enzyme, Mg^{2+} of 1 mmol/L had little effect, Cu^{2+} and SDS could greatly inhibit the enzyme. [Conclusion] These results may provide an important basis for industrial applications of the recombinant dextranucrase.

Keywords: dextranucrase; recombinant *Escherichia coli*; purification; characterization

Supported by the Key Programs of Anhui Province College Science Research (KJ2008A067) and the Ph.D. programs Foundation of Hefei university of technology (GDBJ2008-021)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-551-2901968; E-mail: zhb5678@163.com

Received: 7 March 2008/ Revised: 15 May 2008