

D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的异源表达和酶学性质

温宇威, 张涛, 沐万孟, 江波*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 克隆了来源于 *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶基因, 利用重叠延伸 PCR 技术在 Cb-dpe 基因的上游加入了 P43 启动子, 形成 P43-Cb-dpe, 再将 P43-Cb-dpe 连接到 pMA5 载体上构建出双启动子表达载体, 并导入到 *Bacillus subtilis* WB800 中进行表达; 与单启动子表达系统相比, 双启动子表达载体能够显著提高 Cb-dpe 的表达量。对重组 Cb-DPE 酶进行了分离纯化和酶学性质的研究, 结果表明: 重组 Cb-DPE 的最适温度为 55 ℃, 最适 pH 为 7.0, 在温度 30~40 ℃ 范围内和 pH 6.5~7.5 之间有良好的稳定性; Co^{2+} 、 Mn^{2+} 可显著增强酶活; D-阿洛酮糖为底物时, K_m 为 26.68 mmol/L, 小于果糖的 61.80 mmol/L, 说明该酶对 D-阿洛酮糖的亲性和性比对 D-果糖的高。而在动力学参数方面, 以 D-阿洛酮糖为底物对应的催化效率 K_{cat}/K_m 为 95.8 L/(mmol·min), 大于以果糖作为底物时的 54.1 L/(mmol·min)。

关键词: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; D-阿洛酮糖; 双启动子; 酶学性质

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)03-0289-08

Heterologous Expression and Enzymatic Characterization of D- Psicose 3-Epimerase

WEN Yuwei, ZHANG Tao, MU Wanmeng, JIANG Bo*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The DPE gene from *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 was cloned and expressed in *Bacillus subtilis* WB800. We inserted a P43 promoter directly upstream the DPE gene by virtue of overlap extension PCR, which forming P43-Cb-dpe, and then ligated it into pMA5 shuttle vector thus constructing the pMA5-P43-Cb-dpe expression vector. The recombinant plasmid was imported into *Bacillus subtilis* WB800 for expression. Compared with single promoter expression system, pMA5-P43-Cb-dpe has a palpable promotion of expression level. The expressed recombinant enzyme was purified and its enzymatic properties were studied. The optimum temperature and pH for recombinant enzyme were 55 ℃ and pH 7.0, respectively. It was highly stable at 30~40 ℃ and pH

收稿日期: 2015-10-29

基金项目: 国家 863 计划项目项目(2013AA102102)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品化学及应用酶技术方面的研究。

E-mail: hjiang@jiangnan.edu.cn

引用本文: 温宇威, 张涛, 沐万孟, 等. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的异源表达和酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(03): 289-296.

6.5 ~7.5. Co^{2+} and Mn^{2+} can significantly enhance enzyme activity. The recombinant enzyme's affinity for D-psicose was high than D-fructose. Meanwhile, in terms of the kinetic parameters, the catalytic efficiency K_{cat}/K_m is greater when use D-psicose as substrate.

Keywords: D-psicose 3-epimerase, D-psicose, double promoters, enzymatic properties

D-阿洛酮糖是 D-果糖在 C-3 位置上的差向异构体,它在自然界中天然存在很少,并且价格昂贵。现在,越来越多的研究表明了 D-阿洛酮糖是一种超低能量的糖。D-阿洛酮糖的甜度为蔗糖的 70%,但能量吸收效率仅为蔗糖的 0.3%^[1-2],而且它在消化道中几乎不被吸收^[3]。因此,用它作为食品甜味剂在商业上很有潜力。近来,又有很多的生理研究表明 D-阿洛酮糖具有很多生理功能,包括神经保护作用^[4]、增强胰岛素耐受性^[5-6]、抗氧化活性^[7]、降低血糖和血脂^[8-9]等。此外在食品加工过程中,在食品体系中添加 D-阿洛酮糖可以起到提高凝胶性的作用,同时它还可以与食品体系中的蛋白质发生美拉德反应产生良好的化学风味^[10]。由于 D-阿洛酮糖在自然界中的来源很有限,而且化学合成难度大,因而越来越多的研究转向了利用微生物途径生产 D-阿洛酮糖。

D-塔格糖 3-差向异构酶家族酶能够催化己酮糖在 C-3 位置上发生差向异构化。它能够以相对便宜的糖为底物生成价格昂贵的糖,例如催化 D-塔格糖生成 D-山梨糖,催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖。日本香川大学的 Izumori 研究团队于 1993 年在 *Pseudomonas cichorii* ST-24 中发现了一种可以催化己酮糖 C-3 位差向异构化的酶,命名为 D-己酮糖 3-差向异构酶,因其最适底物为 D-塔格糖,后重新命名为 D-塔格糖 3-差向异构酶^[11]。此后,又有很多 D-塔格糖 3-差向异构酶家族的酶被发现。2009 年,发现了来自 *Rhodobacter sphaeroides* SK011 的 *R. sphaeroides* DTEase^[12];2011 年,发现了来自 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 *C. cellulolyticum* DPEase^[13];2013 年,发现了来自 *Clostridium scindens* ATCC 35704 的 *C. scindens* DPEase^[14];2014 年,发现了来自 *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 的 *C. bolteae* DPEase^[15]。上述所报道的这些 DTE 家族酶都已经在大肠杆菌中被克隆表达,酶学性质也得到了广泛的研究。近几年,陆续又发现多种 DTE 家族酶,

目前,对 DTE 家族酶的研究主要集中于发现新微生物来源的酶和对其酶学性质及晶体结构的探索,而利用 DTE 家族酶工业化生产 D-阿洛酮糖却未见报道。

以大肠杆菌为宿主克隆表达 DTE 家族酶在工业应用上存在着很多的问题,低表达量、内毒素、形成包涵体以及目的蛋白质的错误折叠都是大肠杆菌表达系统的缺点^[16]。枯草芽孢杆菌作为一种食品级表达宿主,越来越受到人们的青睐,主要有以下几个方面原因:1)是一种安全的表达系统;2)高效分泌目的蛋白质的能力;3)没有明显的密码子偏爱性,同时表达产物也不容易形成包涵体;4)转录、翻译、蛋白质折叠和分泌等信息已经被广泛研究;5)发酵条件简单,产物易于分离纯化。所有这些优势使得枯草芽孢杆菌成为了工业上生产酶的细胞工厂。当然,枯草芽孢杆菌作为外源基因的表达宿主也存在一些缺陷,主要包括分泌各种蛋白酶降解外源蛋白质和重组质粒的不稳定性^[17]。

在本研究中,我们构建了以枯草芽孢杆菌为宿主,双启动子表达 DTE 家族酶的表达系统,以此来提高 DTE 家族酶的表达量。我们克隆了来源于 *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 的 DPE 基因,并在其上游插入了 P43 启动子,然后导入到 *B. subtilis* WB800 进行表达,并对重组酶进行了分离纯化和酶学性质的研究。本研究旨在实现 DPE 在食品级微生物枯草芽孢杆菌中的高效表达,为工业化酶法生产 D-阿洛酮糖奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

E. coli DH5 α 和 *B. subtilis* WB800:购于上海生工生物工程有限公司;克隆载体 pMD19-T 和表达载体 pMA5:作者所在实验室保存;PCR 引物:上海生工合成;DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、*Nde* I 和 *Bam* HI 限制性内切酶:购自大连宝生物工程有限公

司;D-阿洛酮糖标样:购自 Sigma 公司;其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 DPE 的扩增 基于 Cb-dpe 和 P43 启动子的基因序列,分别设计相对应的上下游引物对它们进行扩增,见表 1。其中在 P43 上游引物 P1 和 Cb-dpe 下游引物 P4 的 5' 端引入 *Nde* I 和 *Bam* HI 酶切位点,在重组质粒 3' 端添加了 6 个组氨酸标签,方便后面的克隆操作和重组目的蛋白质的分离纯化。而且,P43 的下游引物 P2 和 Cb-dpe 的上游引物 P3 有部分是反向互补的,这样在重叠延伸 PCR 的时候能将 P43 和 Cb-dpe 连接。

表 1 PCR 引物的序列

Table 1 Oligonucleotides used for PCR

引物	序 列
P1	5' -CATATGAGTTATGCAGTTTGTAGAATGTAATGATAGGTGGTATGTTTTTC-3'
P2	5' -AAATACCATATTTTCATGTGTACATTCTCTCT-3'
P3	5' -AGAGAGGAATGTACACATGAAATATGCTATTT-3'
P4	5' - CGATCCTTAGTGCTGGTGGTGGTGGTGATACCAAACACATGCCTG -3'

注:下划线处为酶切位点

1.2.2 双启动子表达载体的构建 分别用引物 P1、P2 扩增出 P43 启动子,引物 P3、P4 扩增出 Cb-dpe 片段后,根据重叠延伸 PCR 的方法,将 P43 和 Cb-dpe 混在一起作为混合模板,再用引物 P1、P4 扩增出 P43-Cb-dpe 片段。将 PCR 后的产物通过胶回收试剂盒回收并纯化目的片段,用 T4 连接酶将 P43-Cb-dpe 连接到克隆载体 pMD19-T 后,得到 pMD19-T-P43-Cb-dpe 载体,将其导入到 *E. coli* DH5 α 中对其进行克隆扩增,然后提取质粒进行测序验证。在得到正确的测序结果后,用 *Nde* I 和 *Bam* HI 双酶切 pMD19-T-P43-Cb-dpe 和 pMA5,回收 P43-Cb-dpe 后利用 T4 连接酶将其连接到 pMA5 上,构建出 pMA5-P43-Cb-dpe 表达载体。最后,将 pMA5-P43-Cb-dpe 导入到宿主 *B. subtilis* WB800 中进行表达。

1.2.3 重组菌株的发酵培养 对于 *E. coli* DH5 α 来说,其培养基是 LB 培养基,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、200 r/min。而对于 *B. subtilis* WB800 来说,先要在 LB 培养基中进行 12 h 的种子液培养,然后以 3%的

接种体积分数接种到发酵培养基中,其培养条件和 *E. coli* DH5 α 的相同。*E. coli* DH5 α 的培养基在接种前需加入终质量浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素,而 *B. subtilis* WB800 的培养基需加入终质量浓度为 100 μ g/mL 的卡那霉素。

1.2.4 双启动子表达载体和单启动子表达载体的表达水平比较 将双启动子表达载体 pMA5-P43-Cb-dpe 和单启动子表达载体 pMA5-Cb-dpe 分别导入到宿主 *B. subtilis* WB800 中进行表达,相同条件下培养,在不同的发酵时间点取样测定菌体生长情况和酶活进行对比。

1.2.5 重组 DPE 的分离纯化 低温离心(8 000 g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)发酵液收集菌体,然后以缓冲液(100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L PBS 钠盐缓冲液, pH 7.0)重悬菌体,超声波破碎重组 *B. subtilis* WB800 8 min (300 W, 开 1 s/关 2 s)后,低温离心(10 000 g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C)后弃去细胞碎片,收集上清液,并将上清液用 0.45 μ m 孔径的醋酸纤维滤膜过滤,得到粗酶液。由于引入了 6 个组氨酸标签,因此采用 Ni²⁺-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和柱对重组酶进行分离纯化。

在低温条件下,预先用 5 个柱体积去离子水冲洗层析柱,再用 3~4 个柱体积的 Binding Buffer(500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0)平衡层析柱,将粗酶液加入层析柱中,然后用 Wash Buffer(500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0)洗去杂蛋白质,最后用 Elution Buffer (500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0)洗脱得到酶液。用 SDS-PAGE 电泳对纯化后的重组蛋白质进行检验。

1.2.6 重组 Cb-DPE 的酶活测定 整个酶反应体系为 1 mL,其中 D-果糖 50 g/L, CoCl₂ 1 mmol/L, 重组酶 1 μ mol/L, PBS 钠盐缓冲液 50 mmol/L, 反应 10 min, 然后煮沸 5 min 终止酶反应。

D-阿洛酮糖检测: 将酶反应产物低温离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min)30 min, 取上清液用 0.22 μ m 微滤膜过滤, 稀释后进行 HPLC 检测。检测条件: Agilent 1260 型高效液相色谱仪, Waters Sugar-Pak 1 钙型阳离子交换柱, Shodex RI-101 型示差折光检测器, 以 0.22 μ m 孔径的醋酸纤维滤膜过滤的纯水作流动相, 流速 0.4 mL/min, 柱温 85 $^{\circ}$ C。

酶活单位 U 定义:在标准酶反应条件下,单位时间内酶催化 D-果糖产生 1 μmol 的 D-阿洛酮糖所需要的酶量定义为 1 个酶活单位。

1.2.7 重组 Cb-DPE 的最适反应温度及其稳定性 将 1 mL 的酶反应体系分别置于 35、40、45、50、55、60、65、70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,参照 1.2.5 方法测定各组酶活,确定最适反应温度,并将酶活最高的一组设为相对酶活 100%。

为了研究重组酶的热稳定性,将纯化后的酶液,分别在 30、40、50、60 $^{\circ}\text{C}$ 下保温,每隔半小时取样,测定残余酶活,定义初始酶活为相对酶活 100%。

1.2.8 重组 Cb-DPE 的最适反应 pH 及其稳定性 将 1 mL 的酶反应体系分别置于 pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 条件下测定各组酶活,确定最适反应 pH,并将酶活最高的一组设为相对酶活 100%。实验中用到的两种不同的缓冲体系:磷酸盐缓冲溶液(pH 6.0~7.0)和 Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.5~9.0)。

为了研究重组酶的 pH 稳定性,将纯化后的酶液分别在 pH 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的缓冲液体中,低温(4 $^{\circ}\text{C}$)保持 2 h,测定残余酶活,定义初始酶活为相对酶活 100%。

1.2.9 不同种类金属离子和金属离子浓度对酶活的影响 为了研究金属离子对酶活的影响,首先在低温条件下(4 $^{\circ}\text{C}$)将纯化好的酶液在透析液中透析 6 h,螯合除去酶液中的金属离子。酶反应中添加不同种类的金属离子(Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+})至终浓度 1 mmol/L,反应 10 min,然后煮沸 5 min,终止酶反应。测定不同种类金属离子对酶活的影响,确定最适金属离子,并将酶活最高的一组设为相对酶活 100%。

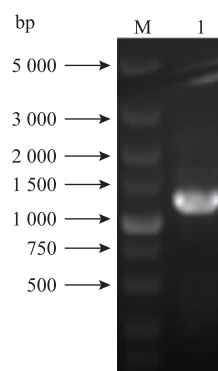
经试验确定最适金属离子后,设置不同金属离子浓度的反应体系,测定酶活,将酶活最高的一组设为相对酶活 100%。

1.2.10 重组 Cb-DPE 的反应动力学常数研究 为了研究重组酶的反应动力学,分别以 5、7.5、10、15、20、50、100、200 mmol/L 的 D-果糖和 D-阿洛酮糖作为底物,测定酶活,通过 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,计算出重组酶的动力学参数: K_m 、 K_{cat} 、 K_{cat}/K_m 。

2 结果与讨论

2.1 Cb-dpe 和 P43 启动子的扩增

分别扩增出 P43 启动子和 Cb-dpe 基因后,利用重叠延伸 PCR 技术,以 P43 启动子和 Cb-dpe 基因为混合模板,再次利用引物 P1 和 P4,将 P43 启动子插入到了 Cb-dpe 基因的上游,得到了 P43-Cb-dpe 片段,琼脂糖凝胶电泳结果显示在 1 200 bp 处出现了明显的扩增条带,见图 1,与预期产物大小吻合。



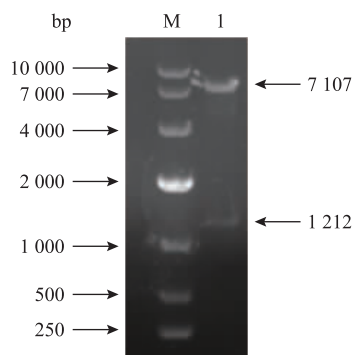
M: DNA marker DL5000; 1: P43-Cb-dpe

图 1 P43-Cb-dpe 的扩增

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of P43 -Cb -dpe amplification

2.2 双启动子表达载体的构建

在得到了 P43-Cb-dpe 片段之后,用 T4 连接酶将其连接到了 pMD19-T 载体上,导入到 *E. coli* DH5 α 中对其进行扩增,然后提取质粒进行测序验证,结果表明扩增出的 P43-Cb-dpe 序列正确。之后,用 *Nde*I 和 *Bam*HI 对 pMD19-T-P43-Cb-dpe 和 pMA5 载体进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳回收 P43-Cb-dpe 目的片段,再次利用 T4 连接酶将其连接到 pMA5 载体上,构建出 pMA5-P43-Cb-dpe 表达载体。由于 pMA5 载体上本身自带有 *Hpa* II 启动子,因此,我们构建的 pMA5-P43-Cb-dpe 是一个双启动子的表达载体。对重组质粒进行 *Nde*I 和 *Bam*HI 的双酶切,得到 pMA5 载体的线性片段和插入的 P43-Cb-dpe 片段。琼脂糖凝胶电泳结果显示的两个条带大概分别为 7 500 bp 和 1 200 bp,见图 2。与 pMA5 载体和 P43-Cb-dpe 大小相符,表明双启动子表达载体构建成功。最后将 pMA5-P43-Cb-dpe 导入到宿主 *B. subtilis* WB800 进行表达。



M: DNA marker DL10000; 1: *Nde* I 和 *Bam* HI 双酶切后的重组 pMA5-P43-Cb-dpe

图 2 pMA5-P43-Cb-dpe 双酶切验证电泳图

Fig. 2 Identification of pMA5-P43-Cb-dpe by enzyme digestion

2.3 双启动子表达载体和单启动子表达载体的表达对比

与单启动子表达载体 pMA5-Cb-dpe 相比,双启动子表达载体 pMA5-P43-Cb-dpe 能够明显提高重组菌株的生长量和目的基因 Cb-dpe 的表达水平,见图 3。在对数生长期后期,双启动子表达载体 pMA5-P43-Cb-dpe 的发酵酶活为 7.63 U/mL,比单启动子表达载体 pMA5-Cb-dpe 提高了 36%。该结果表明,双启动子能够促进 Cb-dpe 在 *B. subtilis* WB800 中的高效表达。启动子是基因表达的重要元件,能够显著影响基因的表达。P43 是来源于 *B. subtilis* 的组成型启动子,有较高的启动强度。在该启动子的调节下,目的基因在对数生长期和稳定期均可稳定表达^[18]。

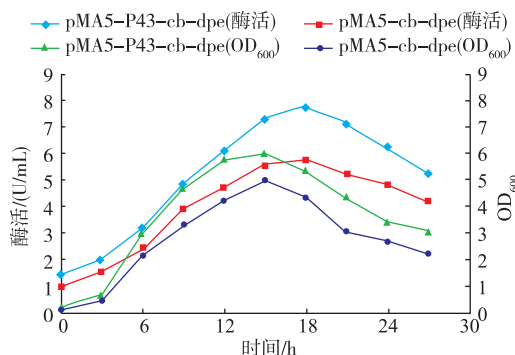
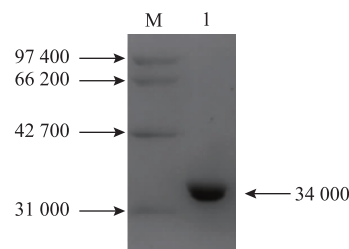


图 3 pMA5-P43-Cb-dpe and pMA5-Cb-dpe 的表达比较
Fig. 3 Enzyme activity and growth comparison of pMA5-P43-Cb-dpe and pMA5-Cb-dpe

2.4 重组 DPE 的分离纯化

对上述得到的重组菌株进行发酵,当菌体浓度达到一定值时离心收集菌体。超声破碎菌体细胞后

再次离心,将得到的上清液过膜得到粗酶液。为了简化蛋白质纯化的步骤,我们在重组蛋白的 C 端引入了 6 个组氨酸标签,而组氨酸能够高度亲和 Ni^{2+} ,因此可以使用 Ni^{2+} -Chelating Sepharose Fast Flow 亲和色谱快速纯化目的蛋白质。然后将纯化后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检验,结果见图 4。纯化的蛋白质大小约为 34 000,与理论蛋白质相对分子量相吻合,证明了 pMA5-P43-Cb-dpe 在 *B. subtilis* WB800 成功表达。



M: 蛋白; 1: 纯化后的 Cb-DPE

图 4 纯化后 Cb-DPE 的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant Cb-DPE

2.5 重组 Cb-DPE 的最适反应温度及其稳定性

本研究通过测定在不同温度下的酶活力,得到了 Cb-DPE 的酶活—温度变化曲线,见图 5。可以看出酶活随温度的变化特征非常明显,随着温度的上升,酶活经历了先上升再下降的过程,与之前描述的规律相符。55 °C 为该酶的最适温度,当温度超过 60 °C 时,酶活急剧下降,在 50~60 °C 之间,其相对酶活仍可维持在 90% 以上。

温度对酶促反应速率的影响表现在两个方面:一方面与一般化学反应一样,当温度升高时,反应速率加快;另一方面由于酶是蛋白质,随着温度升高,酶的变性速度加快,酶会因变性而失活,从而引起了酶反应速率的下降。酶反应的最适温度就是这两种过程平衡的结果。

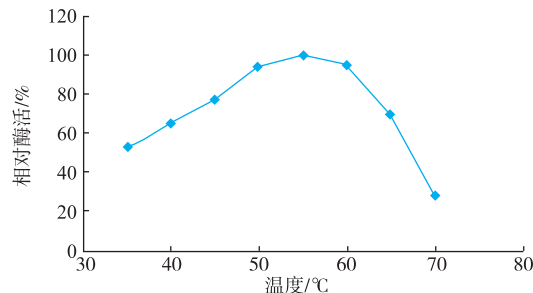


图 5 温度对 Cb-DPE 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of temperature on Cb-DPE activity

Cb-DPE 的热稳定性见图 6。可以看出:30 ℃温育时,4 h 后 Cb-DPE 的残余酶活仍然高于 80%;40 ℃温育时,3 h 后 Cb-DPE 的残余酶活仍然高于 70%,这表明它在 30~40 ℃范围内有良好的稳定性;50 ℃温育时,Cb-DPE 的残余酶活急剧降低,在 2.5 h 以后残余酶活几乎为零;60 ℃温育时,残余酶活在 1 h 就已经消失。与大肠杆菌相比,枯草芽孢杆菌表达的 DPE 的热稳定性有所提高^[15]。

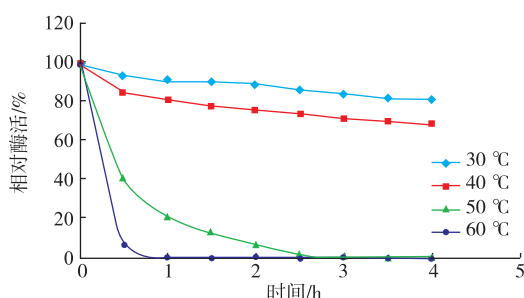


图 6 温度对 Cb-DPE 酶稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on Cb-DPE stability

2.6 重组 Cb-DPE 的最适反应 pH 及其稳定性

酶的生物学特征之一是它对酸碱的敏感性,这表现在酶的活性和稳定性易受环境 pH 的影响。pH 对酶的活性的影响极为显著,通常酶只在一定的 pH 范围内才表现出活性,同一种酶在不同的 pH 值下所表现的活性不同,其表现活性最高时的 pH 值称为酶的最适 pH。不同的酶在特定条件下都有它各自的最适 pH。

pH 对酶活的影响结果见图 7。可以看出随着 pH 的上升,酶活呈现先上升后下降的趋势,在 pH 7.0 时酶活最高,和大肠杆菌表达的 DPE 一致^[15]。工业化生产要求酶的最适 pH 为弱酸性,同时弱酸稳定性要强,因为在偏酸性条件下单糖异构化过程可以降低非特异性副反应以及褐变反应。Cb-DPE 有较宽的 pH 作用范围,但是最适的反应 pH 仍在弱碱性范围(7.0~7.5),与期望的弱酸性 pH 范围仍有一定差距。

Cb-DPE 的 pH 稳定性见图 8。中性环境下,Cb-DPE 有良好的 pH 稳定性。在 pH 6.5~7.5 的缓冲液中保持 2 h 后,残余酶活可在 90%以上;而在偏酸性或偏碱性环境下,酶活损失较大。

各种酶因其氨基酸的组成和构象的不同,特别是因其作用中心构象和微环境的特殊性,酶分子只在一定的 pH 下保持稳定。不同的酶其 pH 稳定区域

不同,有的酶只在稳定 pH 范围内的某一个 pH 区才有活性,超出了这个 pH 范围,酶活力将会大幅度降低。酶在过酸或过碱的环境中放置时间过长,都会导致不可逆的失活;当在偏酸或偏碱的环境中放置短暂的时间,虽然酶活力发生下降,但测定酶活时,在最适 pH 下测定,活力可以恢复到正常状态,这种 pH 的效应仅仅引起酶活性中心及微环境出现的可逆变化,但不导致整个酶分子构象出现不可逆的变化。

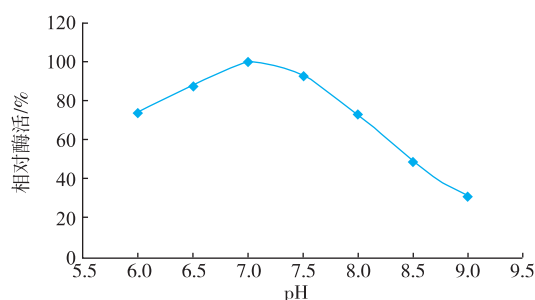


图 7 pH 对 Cb-DPE 酶活力的影响

Fig. 7 Effect of pH on Cb-DPE activity

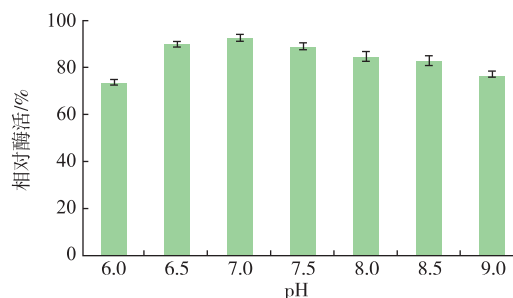


图 8 pH 对 Cb-DPE 酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on Cb-DPE stability

2.7 不同金属离子和金属离子浓度对酶活的影响

金属离子对酶的作用有两种,一是作为酶的辅助因子起作用,二是作为激活剂起作用。对于差向异构酶来说,金属离子通常与其活性中心的残基结合,具有稳定蛋白质空间结构的作用,是一种重要的辅基。已报道的 DTE 家族酶均表现出金属依赖性,只有在金属离子存在的情况下才有酶活。

不同金属离子对 Cb-DPE 酶活的影响见图 9。以纯化后未经 EDTA 处理的原始酶为对照,可以看出不同的金属离子对酶活的影响有显著的不同, Mg^{2+} 和 Zn^{2+} 对该重组酶的催化活性有明显抑制作用,而 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 均呈现对酶催化活性增强的作用。有研究表明,金属离子在催化过程中能够锚定底物

与酶的结合以及稳定生成的中间体的构象^[19]。至于为什么只有 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活有提高目前尚未得知。

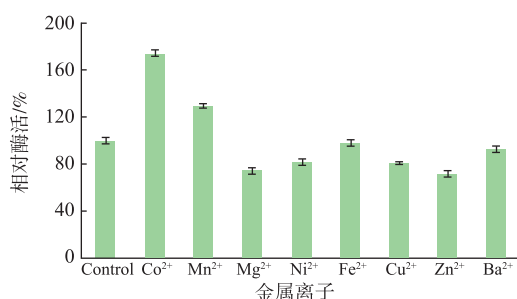


图9 金属离子对 Cb-DPE 酶活力的影响

Fig. 9 Effect of different metal ions on Cb-DPE activity

由于 Co^{2+} 的增强作用大于 Mn^{2+} , 因此进一步考察不同浓度的 Co^{2+} 对酶活的影响。图 10 呈现了 Co^{2+} 浓度对酶活的影响, 当体系中不存在 Co^{2+} 时, Cb-DPE 不表现出催化作用, 这说明酶催化反应是依靠 Co^{2+} 的; 当在体系中添加 Co^{2+} 的时候, 酶催化反应速度急剧上升, 并于 0.4 mmol/L 时达到最高, 当 Co^{2+} 浓度大于 1 mmol/L 时, 随着 Co^{2+} 浓度的上升, 酶催化反应的速度趋于稳定。这可能是由于酶和金属离子的结合趋于饱和。

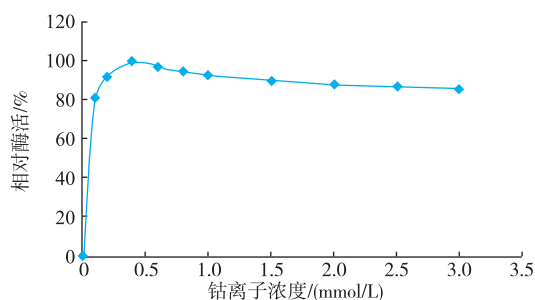


图10 Co^{2+} 浓度对 Cb-DPE 酶活力的影响

Fig. 10 Effect of Co^{2+} concentration on Cb-DPE activity

2.8 重组酶的反应动力学常数研究

K_m 是酶的一个特性常数, 其大小只与酶的性质有关, 而与酶浓度无关。 K_m 值可以判断酶的专一性和对底物的亲和性, 有的酶可作用于多种底物, 每种底物都有对应的 K_m 值, 其中 K_m 值最小的底物称为该酶的最适底物。 K_{cat} 称之为催化常数, 是指在底物浓度处于饱和状态下, 每摩尔酶活性部位每秒钟

转化为产物的底物的摩尔数, K_{cat} 值越大, 表示酶的催化速率越高。 K_{cat}/K_m 是指在酶催化作用下, 底物生成产物的表观二级速率常数, 也称为专一性常数或催化效率。

重组 Cb-DPE 的动力学常数见表 2。当以 D-阿洛酮糖为底物时, 其 K_m 值为 26.68 mmol/L, 小于以 D-果糖为底物时的 61.80 mmol/L, 这说明该酶对 D-阿洛酮糖的亲和性更高, 最适底物是 D-阿洛酮糖; 而且以 D-阿洛酮糖为底物时, Cb-DPE 的催化效率 K_{cat}/K_m 为 95.8 L/(mmol·min), 大于以果糖作为底物时的 54.1 L/(mmol·min)。

表2 Cb-DPE 的底物专一性和动力学常数

Table 2 Relative activities and kinetic parameters of Cb-DPE for different substrates

底物	K_m /(mmol/L)	K_{cat} /min ⁻¹	K_{cat}/K_m /(L/(mmol·min))
D-阿洛酮糖	26.68	2556	95.8
D-果糖	61.80	3345	54.1

3 结 语

扩增了来源于 *Clostridium boltea* ATCC BAA-613 的 DPE 基因, 利用重叠延伸 PCR 技术在目的基因上游加入 P43 启动子, 扩增出 P43-Cb-dpe, 再将其连接到 pMA5 载体上成功构建出了双启动子表达载体 pMA5-P43-Cb-dpe, 以此来提高目的基因的表达水平。将重组质粒导入到食品级表达宿主 *B. subtilis* WB800 中进行表达, 与单启动子表达载体相比, 双启动子表达载体能够显著提高 Cb-dpe 的表达量。对目的蛋白质分离纯化后研究了其酶学性质, 结果表明重组 DPE 的最适温度为 55 ℃, 最适 pH 为 7.0, 在温度 30~40 ℃ 范围内和 pH 6.5~7.5 之间有良好的稳定性。 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 可显著增强酶活。此外我们还研究了 Cb-DPE 的底物特异性, 发现该酶对 D-阿洛酮糖的亲和性比对 D-果糖的高。而在动力学参数方面, 以 D-阿洛酮糖为底物时, Cb-DPE 的催化效率 K_{cat}/K_m 也更大。重组 DPE 的酶学性质与大肠杆菌表达的 DPE 相似, 这表明 DPE 在枯草芽孢杆菌中的表达不会改变其酶学性质, 为 DPE 食品级表达的工业化应用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] OSHIMA H, KIMURA I, IZUMORI K. Psicose contents in various food products and its origin[J]. **Food Science and Technology Research**, 2006, 12(2) : 137-143.
- [2] FUKADA K, ISHII T, TANAKA K, et al. Crystal structure, solubility, and mutarotation of the rare monosaccharide D-psicose[J]. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 2010, 83(10) : 1193-1197.
- [3] MATSUO T, TANAKA T, HASHIGUCHI M, et al. Metabolic effects of D-psicose in rats; studies on faecal and urinary excretion and caecal fermentation[J]. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 2003, 12(2) : 225-231.
- [4] TAKATA M K, YAMAGUCHI F, NAKANOSE K, et al. Neuroprotective effect of D-psicose on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2005, 100(5) : 511-516.
- [5] HOSSAIN A, YAMAGUCHI F, MATSUNAGA T, et al. Rare sugar D-psicose protects pancreas β -islets and thus improves insulin resistance in OLETF rats[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2012, 425(4) : 717-723.
- [6] HOSSAIN M A, KITAGAKI S, NAKANO D, et al. Rare sugar D-psicose improves insulin sensitivity and glucose tolerance in type 2 diabetes otsuka long-evans tokushima fatty (OLETF) rats[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011, 405(1) : 7-12.
- [7] MURATA A, SEKIYA K, WATANABE Y, et al. A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2003, 96(1) : 89-91.
- [8] HOSSEIN M A, YAMAGUCHI F, KITAGAKI S, et al. Ameliorative effect of a rare sugar D-psicose on glucose intolerance in type 2 diabetic rat model[J]. **Journal of Physiological Sciences**, 2010, 60 : S96-S96.
- [9] TOKUDA M, HOSSAIN M A, KITAGAKI S. Rare sugar D-psicose ameliorates glucose intolerance through glucokinase activation in the liver and suppression of pancreatic islet injury in type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats[J]. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 2010, 25 : A124-A124.
- [10] SUN Y, HAYAKAWA S, IZUMORI K. Antioxidative activity and gelling rheological properties of dried egg white glycated with a rare keto-hexose through the maillard reaction[J]. **Journal of Food Science**, 2004, 69(6) : C427-C434.
- [11] ITOH H, OKAYA H, KHAN A R, et al. Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24 [J]. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 1994, 58(12) : 2168-2171.
- [12] ZHANG L, MU W, JIANG B, et al. Characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts D-fructose into D-psicose[J]. **Biotechnology Letters**, 2009, 31(6) : 857-862.
- [13] MU W, CHU F, XING Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3- epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011, 59(14) : 7785-7792.
- [14] ZHANG W, FANG D, XING Q, et al. Characterization of a novel metal-dependent D-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704[J]. **Plos One**, 2013, 8(4) : e62987.
- [15] JIA M, MU W, CHU F, et al. A d-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium bolteae* for d-psicose production; cloning, expression, purification, and characterization[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(2) : 717-725.
- [16] CONTRERAS J A R, PEDRAZA R M, ORDONEZ L G, et al. Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in *Bacillus subtilis*[J]. **Plasmid**, 2010, 64(3) : 170-176.
- [17] WU S C, YEUNG J C, DUAN Y, et al. Functional production and characterization of a fibrin-specific single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis*: effects of molecular chaperones and a wall-bound protease on antibody fragment production[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2002, 68(7) : 3261-3269.
- [18] YE R, KIM J H, KIM B G, et al. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1999, 62(1) : 87-96.
- [19] KIM K, KIM H J, OH D K, et al. Crystal structure of D-psicose 3-epimerase from agrobacterium tumefaciens and its complex with true substrate D-fructose: a pivotal role of metal in catalysis, an active site for the non-phosphorylated substrate, and its conformational changes[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2006, 361(5) : 920-931.