

D-甘露糖异构酶的克隆表达及酶法制备 D-甘露糖

胡兴^{1,2}, 张涛¹, 沐万孟¹, 缪铭¹, 江波^{*1}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 将大肠杆菌 BL21 中的 D-甘露糖异构酶(MIase) 基因 *yihS* 克隆到表达载体 pET-28a(+) 中, 并转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中表达。重组菌株经 IPTG 诱导培养 6 h 后 MIase 发酵酶活可达 4.2 U/mL。重组 MIase 生产 D-甘露糖时不需要金属离子的参与。该酶在 40 °C 和 pH 7.5 条件下表现出催化 D-果糖的最高活性, 转化率为 25% 左右; 通过研究底物浓度对酶活性的影响, 得出该酶的活性不受底物浓度的抑制, 以 D-果糖为底物时, 动力学参数 K_m 为 123.32 mmol/L, V_{max} 为 113.64 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$, 催化效率 k_{cat}/K_m 为 0.691 ($\text{s} \cdot \text{mmol/L}$)。

关键词: D-甘露糖; D-甘露糖异构酶; 表达; 生物制备

中图分类号: Q 814.1 文章编号: 1673-1689(2019)04-0058-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.009

Cloning and Expression of D-Mannose Isomerase from *Escherichia coli* BL21 and its Application for D-Mannose Production

HU Xing^{1,2}, ZHANG Tao¹, MU Wanmeng¹, MIAO Ming¹, JIANG Bo^{*1}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The gene encoding D-mannose isomerase (MIase) from *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 was cloned into expression vector pET-28a (+), and then the recombinant plasmid was transformed into the strain *E. coli* BL21 (DE3). Efficient MIase intracellular expression by the recombinant *E. coli* BL21 was achieved with an activity of 4.2 U/mL (D-mannose forming) after IPTG induction for 6 h. The enzyme was identified as a metal-independent protein. The enzyme activity reached the maximum with a conversion rate of 25% at 40 °C and pH 7.5. Using D-fructose as the substrate, a K_m value of 123.32 mmol/L, V_{max} value of 113.64 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ and catalytic efficiency k_{cat}/K_m value of 0.691 $\text{s} \cdot \text{mmol/L}$ were estimated, respectively.

Keywords: D-mannose, D-mannose isomerase, expression, biotransformation

甘露糖是一种单糖, 其名称来源于圣经中的英文单词 manna(甘露)一词^[1-2]。D-甘露糖与 D-葡萄

糖互为 C2 位差向异构体(图 1), 是自然界中最常见的构型。食用富含 D-甘露糖的食物被认为对健康

收稿日期: 2016-09-04

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102); 国家自然科学基金项目(31230057)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 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: bjiang@jiangnan.edu.cn

引用本文: 胡兴, 张涛, 沐万孟, 等. D-甘露糖异构酶的克隆表达及酶法制备 D-甘露糖[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 58-63.

有益,D-甘露糖主要存在于膳食纤维中半纤维素中。研究表明 D-甘露糖与某些特定的免疫反应相关^[3],能预防细菌或病毒感染^[4],并且可以作为添加剂用在家禽饲料中,以防止沙门菌污染^[5]。此外甘露糖也可以作为原料用于多种维生素、抗肿瘤试剂和免疫刺激试剂的生产^[6]。

目前,制备 D-甘露糖的方法主要有提取法^[7]、化学法^[8]和生物技术^[9]等方法,其中目前商业售出的 D-甘露糖大都由提取法制得,但与其他方法相比,酶法等生物技术方法在 D-甘露糖制备中的地位越来越重要^[10],由廉价的糖经酶异构化生产 D-甘露糖是一种新型的绿色技术^[11],具有毒性低、安全性高、反应条件温和及副产物少等优点。目前兴起的酶法生产甘露糖,主要通过 D-甘露糖异构酶(D-mannose isomerase, MIase, EC 5.3.1.7)生物转化 D-果糖而来^[12]。

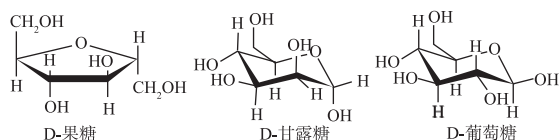


图1 D-果糖、D-甘露糖和 D-葡萄糖的结构

Fig. 1 Structure of D-fructose, D-mannose and D-glucose

然而,目前国内有关 MIase 基因表达及其用于转化果糖生产甘露糖的报道较少,未成系统。因此,本研究主要从酶法制备角度考虑,对 MIase 的克隆表达,以果糖为底物时的酶学性质及生产应用进行分析,旨在为推动 MIase 的研究与开发、D-甘露糖的生物制备提供理论指导和应用基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

基因来源菌株 *E. coli* BL21。克隆宿主 *E. coli* DH5 α 、表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保藏。*E. coli* 表达载体 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司。2 $\times$ TaqPCR Master Mix、DNA 回收试剂盒、PCR 引物合成及测序工作均委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 重组 MIase 的克隆及表达

E. coli BL21 基因组 DNA 抽提按细菌基因组 DNA 的小量制备方法^[13]进行。参考 GenBank 中已公开的大肠杆菌 MIase 基因 (*yihS*; NCBI 基因 ID: 753778095; 蛋白 ID: AJH12524) 序列的特征,设计

合成 PCR 引物。P1: 5'-GCTCTAGAATGAAATGGT TTAACACCCTAAGCC -3', P2: 5'-CCGCTCGAGTT TCGCATTAATATCCAGCAGACC-3', 其中, P1 包含 *Xba* I 限制性酶切位点, P2 包含 *Xho* I 限制性酶切位点。用 *E. coli* BL21 全基因组 DNA 做模板进行 PCR 扩增,反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切的 pMD-19T-*yihS*, 与同样双酶切的质粒 pET-28a (+)-*yihS* 连接, 然后转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中。挑选单菌落进行测序验证及酶活验证。

1.3 发酵培养

将上述种子培养液以初始 $A_{600\text{nm}}=0.02$ 的接种量转接至装液量为体积分数 10% 的 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0)中,在 37 $^{\circ}$ C, 200 r/min 的摇床中发酵培养,测定培养液的吸光值,当 $A_{600\text{nm}}$ 达到 0.6~0.8 时,添加终浓度为 1 mmol/L 的异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG),于 28 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h。接种前培养基中添加终浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素。

1.4 MIase 的分离纯化

菌体收集 $\rightarrow$ 超声破碎 $\rightarrow$ 离心(12 000 g , 20 min) $\rightarrow$ 酶上清液 $\rightarrow$ Ni²⁺-亲和层析柱 $\rightarrow$ 透析 $\rightarrow$ SDS-PAGE 鉴定。

1.5 MIase 酶学性质研究

1.5.1 温度对酶活及热稳定性的影响 酶反应分别在 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 $^{\circ}$ C, pH 7.5 条件下进行,以最高酶活为相对酶活 100%,比较得到 MIase 的最适反应温度;酶液分别在 20、25、30、35、40、45、50、55、60 $^{\circ}$ C 下保温 4 h,每隔 0.5 h 取样,在 40 $^{\circ}$ C、pH 7.5 条件下测定然后测定残余酶活,其中定义 MIase 的原始活力为最高酶活 100%。

1.5.2 pH 对酶活及热稳定性的影响 将酶液分别置于 pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的不同缓冲液中于 40 $^{\circ}$ C 测定相对酶活力以测得最适 pH,以最高酶活为相对酶活 100%;酶液分别在 pH 4.0~9.0 的缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 下保存 24 h,在 40 $^{\circ}$ C、pH 7.5 条件下测定残余酶活,其中定义 MIase 的原始活力为最高酶活 100%。

1.5.3 不同金属离子对酶活的影响 经 Ni²⁺-亲和层析柱纯化得到的酶液置于 10 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液(pH 7.5)中于 4 $^{\circ}$ C 透析半天以去除溶液

中的金属离子;然后用对应的不含EDTA的磷酸缓冲液(pH 7.5)于4℃透析6 h(重复3次)以去除溶液中的EDTA;为了研究不同金属离子对酶活性的影响,反应体系中分别加入1 mmol/L的不同金属离子,如 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ba^{2+} 等测定对应的酶活力,其中定义不含金属离子的酶液活力为100%。

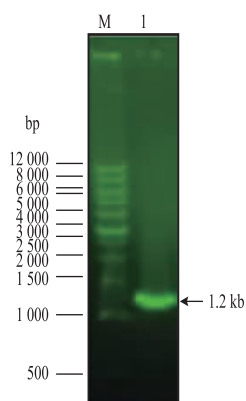
1.6 MIase 酶活定义

MIase 转化 D-果糖的酶活定义为最适条件下每分钟产生 1 μmol 的 D-甘露糖所需酶量。产物 D-甘露糖采用 HPLC-RI 法进行测定,固定相: Sugar-Pak I(300 mm $\times$ 6.5 mm i.d.) 色谱柱,柱温 85℃;流动相:超纯水;流速为 0.4 mL/min,进样量为 10 μL ;检测器:Shodex 示差折光检测器,检测温度 30℃。

2 结果与讨论

2.1 重组质粒 pET-28a(+)-yihS 的构建

从 *E.coli* BL21 基因组中 PCR 扩增目的基因呈现出一条 1.2 kb 左右特异性的条带,与预期大小(图 2)一致,进一步获得 pMD19-T-yihS。



M:DNA 标准品;1:yihS 基因的 PCR 克隆产物

图 2 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Analysis by agarose gel electrophoresis of PCR product

将 pMD19-T-yihS 和 pET-28a(+)质粒,用 *Xba*I 和 *Xho*I 进行双酶切,用 T4 连接酶进行连接,构建重组质粒 pET-28a(+)-yihS,其构建过程如图 3 所示,重组质粒 pET-28a(+)-yihS 经 *Xba*I 和 *Xho*I 双酶切后,得到 5.3 kb 左右和 1.2 kb 左右 2 条带;经 *Hind* III 单酶切可见条带大小约为 6.5 kb,与理

论值相当,经测序验证目的基因得到了正确扩增,重组质粒构建成功。将重组载体转化入 *E.coli* BL21 经卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LB 平板筛选后,挑取阳性克隆子,并成功获得一株包含 MIase 基因的大肠杆菌重组菌。

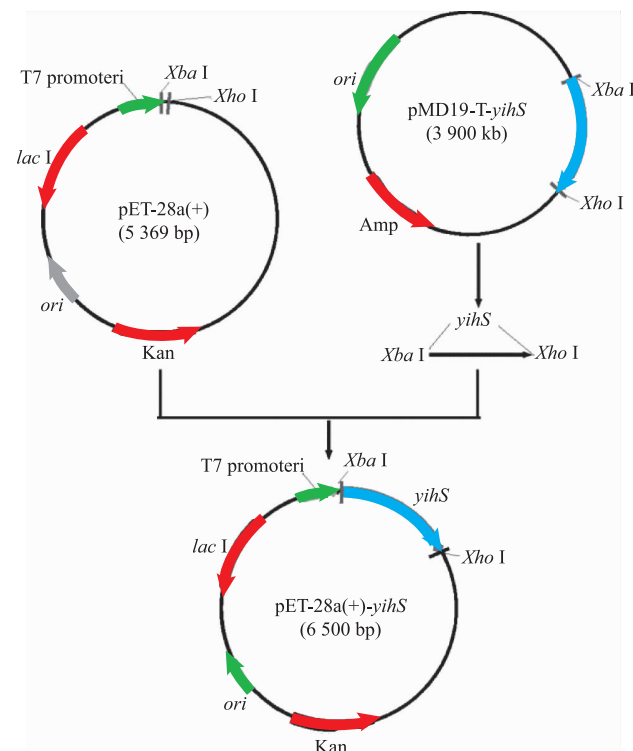


图 3 pET-28a(+)-yihS 重组质粒构建过程

Fig. 3 Construction of recombinant plasmid pET-28a(+)-yihS

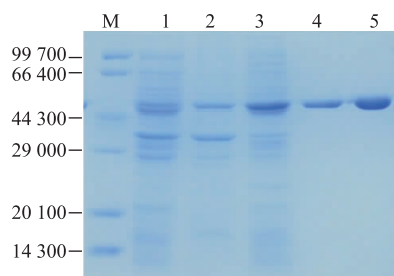
2.2 MIase 的表达及分离纯化结果

SDS-PAGE 电泳显示,MIase 在表达宿主 *E.coli* BL21 (DE3) 中经 IPTG 诱导后成功获得表达,且主要为胞内表达,其大小约为 45×10^3 (图 4, Lane 1),与文献报道的 MIase 的单体分子量大小一致。经计算,摇瓶发酵酶活约为 4.2 U/mL。发酵菌体破碎后悬浮液经 12 000 r/min,4℃离心即得破壁上清粗酶液,带有 His-tag 标记的重组蛋白表达系统可通过 Ni^{2+} 离子亲和柱将重组蛋白进行专一性的分离,如图 4(Lane 5)所示,在 45×10^3 处得到目的蛋白质,其相对分子质量大小与预测符合,表明 MIase 基因得到正确表达。

2.3 最佳酶转化反应的条件

2.3.1 MIase 的最适温度及温度稳定性 随着温度升高,酶蛋白的活性下降;但温度的升高又会提高

反应速度,因此酶反应的最适温度就是这两种影响的综合结果^[14]。本研究在 10~60 ℃范围内分别测定转化反应过程中的酶活力,得到 MIase 酶活与温度变化曲线,如图 5 所示,酶活随着温度上升,到 40 ℃时酶活达到最大,高于 40 ℃时酶活开始降低,因此,重组的 MIase 最适温度为 40 ℃。



M: 蛋白质分子质量标准;1: 菌体破碎上清;2: 未与 Ni^{2+} 柱结合的蛋白质;3: 洗脱杂蛋白质;4: Ni^{2+} 柱低浓度咪唑洗脱目的蛋白;5: Ni^{2+} 柱高浓度咪唑洗脱目的蛋白

图 4 MIase 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant D-mannose isomerase expressed in *E. coli* at different stages of purification procedure

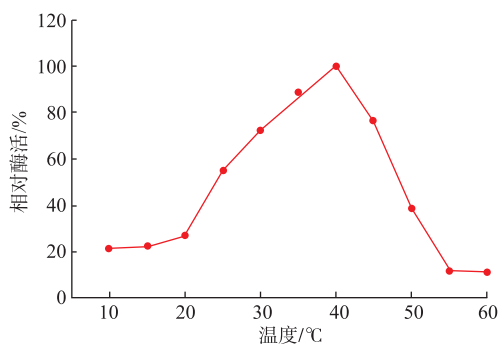


图 5 重组 MIase 的最适温度

Fig. 5 Optimum temperature of recombinant MIase

MIase 的热稳定性如图 6 所示,随着酶热处理时间加长,酶活力随着温度的增加而降低,尤其当酶处理温度高于 50 ℃时,残余酶活急剧下降,且酶活大于 60 ℃时,温育 30 min 以上,酶活几乎完全丧失。表明 MIase 在温度大于 50 ℃时热稳定性很差,酶几乎失去生物活性。

2.3.2 pH 对 MIase 酶活及稳定性的影响 由于酶的活性和酶的稳定性与反应体系中 pH 关系密切,直接影响酶与底物的结合,因此酶的最适 pH 是酶最重要的生物特性之一^[15-16]。本实验考察了重组 MIase 在 pH 4.0~9.0 范围下酶活变化并得到其稳定

性曲线,如图 7 和图 8 所示,pH 4.0~5.5 范围内重组酶完全丧失转化能力。而中性及碱性条件下,酶转化能力相对较高。当 pH 为 7.0~7.5 时,MIase 酶活稳定性最好。

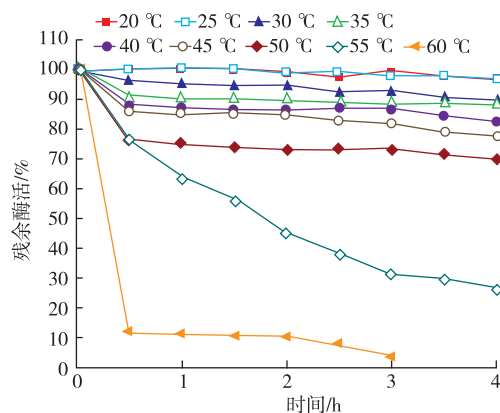


图 6 重组 MIase 的温度稳定性

Fig. 6 Temperature stability of recombinant MIase

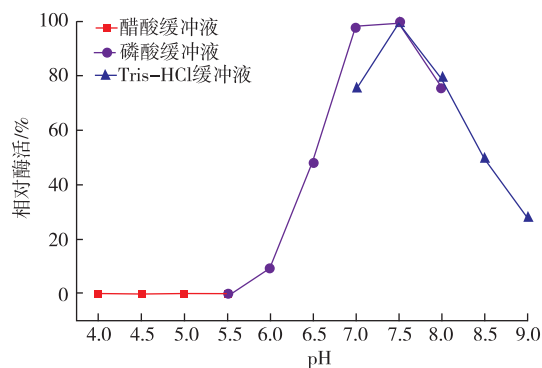


图 7 pH 对 MIase 酶活性的影响

Fig. 7 Effect of pH on D-mannose isomerase activity

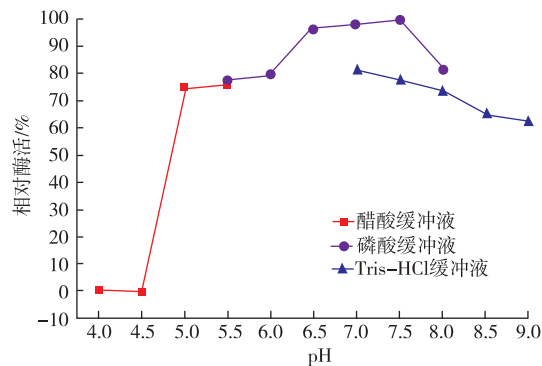


图 8 pH 对 MIase 酶稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on D-mannose isomerase stability

2.3.3 不同金属离子对 MIase 酶活的影响 见图 9,与空白对照相比, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 的加入可以稍微提高

MIase 的酶活。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 则能够完全抑制酶转化反应,因此,MIase 是非金属依赖型的酶。

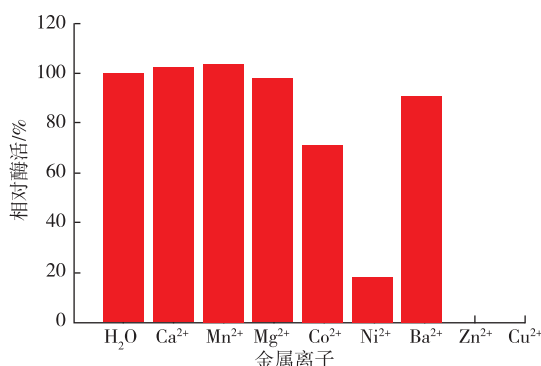


图9 金属离子对重组 MIase 酶活性的影响

Fig. 9 Effect of cations on activity of recombinant MIase

表1 MIase 的动力学常数

Table 1 Relative activities and kinetic parameters of D-mannose isomerase for different substrates

底物	$K_m/(\text{mmol/L})$	$V_{\max}/[\mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg})]$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$(k_{\text{cat}}/K_m)/(\text{s} \cdot (\text{mmol/L}))$
D-果糖	123.32	113.64	85.227	0.691
D-甘露糖	77.94	212.77	159.57	2.047

2.3.4 D-甘露糖的酶法制备 在 D-果糖质量浓度为 50、100、200、400 g/L 下测定转化反应,其他条件不变。从图 10 中可以看出,在 60 min 之内,随着底物质量浓度的逐渐增加,D-甘露糖的生成量逐渐增加,60 min 之后,底物质量浓度为 400 g/L 的产物生成率与低底物质量浓度条件下产物生成率相当,因此,未来大规模酶转化生产 D-甘露糖时可以考虑 400 g/L 以上的 D-果糖浓度为反应的底物质量浓度。

3 结 语

本研究采用 *E. coli* BL21 提取的 DNA 为模板,通过 PCR 方法扩增出 MIase 基因 *yihS*,克隆入表达载体 pET-28a(+)中,将其转入宿主菌 BL21(DE3)中后,目的蛋白获得较高表达量。采用镍柱纯化后的 MIase,以 D-果糖为底物重点研究了反应温度、反应 pH、底物浓度及不同金属阳离子对酶活性的

2.3.5 MIase 的反应动力学参数 酶促反应动力学性质的研究是建立酶催化反应过程动力学模型的基础,有助于认识整个酶促反应过程的动力学机制^[17]。测定酶促反应动力学常数时,选择适合的底物浓度、酶浓度和反应温度非常重要^[18]。在浓度为 1~2 000 mmol/L 范围内,配制一系列非线性浓度的 D-果糖和 D-甘露糖溶液的底物溶液,加入定量酶液后,在 40 ℃ 分别反应 10 min 和 5 min,用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,以底物浓度的倒数 $1/[S]$ 为横坐标,反应初速度的倒数 $1/V$ 为纵坐标作图,求得该酶分别以 MIase 和 D-果糖为底物的酶促反应动力学常数 K_m 和催化常数 k_{cat} ,见表 1。

k_{cat}/K_m 是酶与底物反应形成产物的表观二级速率常数,又名催化效率或专一性常数^[19]。由表 1 的结果可以看出,当以 D-甘露糖为底物时, k_{cat}/K_m 值更大,说明该 MIase 对底物 D-甘露糖的整体催化效率较高。

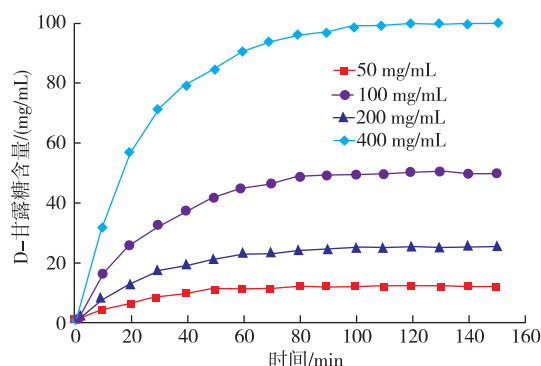


图10 不同底物质量浓度对 MIase 催化反应的影响

Fig. 10 Production of D-psicose from D-fructose by *E.coli* MIase

影响。研究表明:此重组 MIase 是非金属依赖型的酶,以果糖为底物生产 D-甘露糖的最佳转化温度为 40 ℃,最佳 pH 为 7.5。

参考文献:

- [1] TONNESEN A S. Clinical pharmacology and use of diuretics[M]. ASA Refresher Courses Anesthesiol, 1983, 11: 217-236.
- [2] HU X, ZHANG P, MIAO M, et al. D-mannose: properties, production, and applications: an overview[J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2016, 15(4): 773-785.
- [3] SHARMA A, JEN R, BUTLER A M, et al. The developing human preterm neonatal immune system: A case for more research in this area[J]. **Clinical Immunology**, 2012, 145(1): 61-68.
- [4] DIELBANZA E J, SCHAEFFER A J. Urinary tract infections in women[J]. **Medical Clinics of North America**, 2011, 95: 27-41.
- [5] OYOFO B A, DELOACH J R, CORRIER D E, et al. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose[J]. **Poultry Science**, 1989, 68: 1357-1360.
- [6] RANTA K, NIEMINEN K, EKHOLM F S, et al. Evaluation of immunostimulatory activities of synthetic mannose-containing structures mimicking the β -(1 $\rightarrow$ 2)-linked cell wall mannans of *Candida albicans*[J]. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2012, 19: 1889-1893.
- [7] MENDONCA R T, AGUAYO M G, RODRIGUEZ J, et al. Extraction and characterization of hemicelluloses from *Pinus radiata* and its feasibility for bioethanol production[J]. **Revista Arvore**, 2013, 37(1): 175-180.
- [8] ZHAO Guanghui, WANG Guanbin, LI Junping, et al. The orthogonal experiment analysis on the producing mannose from dextrose by catalyzing effect of ammonium molybdate[J]. **Contemporary Chemical Industry**, 2005, 34: 39-41. (in Chinese)
- [9] TAKASAKI Y, HINOKI K, KATAOKA Y, et al. Enzymatic production of d-mannose from d-fructose by mannose isomerase[J]. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 1993, 76(3): 237-239.
- [10] JIA Ming, MU Wangmeng, ZHANG Tao, et al. Expression of D-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(11): 1129-1135. (in Chinese)
- [11] BICAS J, SILVA J, DIONISIO A. Biotechnological production of bio flavors and functional sugars[J]. **Food Science and Technology International**, 2010, 30: 7-18.
- [12] PALLERONI N J, DOUDOROFF M. Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1956, 218(1): 535-548.
- [13] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a Laboratory Manual[M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] HE Feng, LIU Lijian, ZHUO Renxi, et al. Immobilization of papain on porous silica beads: preparation and characterization[J]. **Ion Exchange and Adsorption**, 1997, 13(3): 290-294. (in Chinese)
- [15] HANG Hua, ZHAO Meng, ZHOU Liuming, et al. Research advances on inulin fructotransferase[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2011, 37(1): 117-121. (in Chinese)
- [16] TANG Qunfang, LI Jianghua, LIU Long, et al. Enhanced production of solvent-stable alpha glycosidase from bacillus licheniformis jxc-1 by an optimal feeding strategy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 1: 12-18. (in Chinese)
- [17] 程丽芳. 解纤维热酸菌 L-阿拉伯糖异构酶的克隆表达、性质研究及分子改造[D]. 无锡: 江南大学, 2010.
- [18] WANG Jiangbing, DENG Yong. Hydrolysis of soybean protein/solate with alcalase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2002, 23(1): 61-63. (in Chinese)
- [19] ZHOU Rong, YANG Jiguo, WANG Yonghua, et al. Research on enzymatic and kinetic characteristics of a new lipase[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2007, 23(9): 8-11. (in Chinese)