

植物乳杆菌 ST-Ⅲ的 β -果糖苷酶在大肠杆菌中的表达及优化

陈 臣^{1,2}, 周方方², 任 婧², 刘振民², 陈 卫^{1,*}

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2.乳业生物技术国家重点实验室, 光明乳业股份有限公司研究院, 上海 200436)

摘 要: 为了了解植物乳杆菌利用低聚果糖的机理, 以一株具有良好的利用低聚果糖能力的植物乳杆菌 ST-Ⅲ基因组为模板, 成功地扩增出 β -果糖苷酶基因(*sacA*), 基因片段长度为 1506bp, 编码 501 个氨基酸。将扩增出的目的片段克隆到 pet28(a)(+) 载体上, 在大肠杆菌中进行表达, 并优化了表达条件。IPTG 浓度 0.1mmol/L, 诱导温度为 16℃, 诱导 12h 是该酶的最佳表达条件, 比酶活为 3.4U/mg; 亲和层析纯化后, 比酶活达到 107.0U/mg。

关键词: 植物乳杆菌, β -果糖苷酶, 低聚果糖

Expression and optimization of a β -fructofuranosidase from *Lactobacillus plantarum* ST-Ⅲ in *Escherichia coli*

CHEN Chen^{1,2}, ZHOU Fang-fang², REN Jing², LIU Zhen-min², CHEN Wei^{1,*}

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.State Key Laboratory of Dairy Biotechnology, Institute of Bright Dairy & Food Co., Ltd., Shanghai 200436, China)

Abstract: To establish the molecular mechanisms of fructooligosaccharides are metabolized by *Lactobacillus plantarum* species, a β -fructofuranosidase gene (designated *sacA*) from a fructooligosaccharides-fermenting strain *Lactobacillus plantarum* ST-Ⅲ was cloned into *Escherichia coli*, and the over-expression conditions of the recombinant protein were optimized. The *sacA* gene from *L. plantarum* ST-Ⅲ consisted of 1506 nucleotides, encoding a 501 amino acid polypeptide. The specific activity of enzyme was 3.4U/mg when induced with 0.1mmol/L IPTG for 12h at 16℃. The enzyme was then purified with nickel ion affinity chromatography and the specific activity was 107.0U/mg for the purified recombinant protein.

Key words: *Lactobacillus plantarum*; β -fructofuranosidase; fructooligosaccharides

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)11-0155-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.11.026

低聚果糖(Fructooligosaccharides, FOS)又名蔗果低聚糖,是指 1~9 个果糖基以 β -2,1 键或 β -2,6 键连接在蔗糖的 D-果糖基上而形成的混合物。低聚果糖不能被人体直接消化吸收,当它到达人体胃肠道时,可有选择地刺激肠道中有益菌(如双歧杆菌和部分乳杆菌)增殖^[1],同时代谢产生的短链脂肪酸^[2],使肠道内 pH 降低,抑制外源性致病菌和肠道内固有真菌等的生长繁殖,起到调节肠道菌群的作用。

双歧杆菌和乳杆菌之所以具有利用低聚果糖能力是因为它含有能分解 β -2,1 键或 β -2,6 键糖苷键的酶—— β -呋喃果糖苷酶。 β -呋喃果糖苷酶(β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26),又名转化酶,催化 β -呋喃果糖苷分子中非还原端的 β -呋喃果糖苷

键水解。 β -呋喃果糖苷酶属于糖苷水解酶 32 家族^[3],能够水解蔗糖和低聚果糖,此外还可水解菊糖、水苏糖、棉子糖等^[4]。双歧杆菌的呋喃果糖苷酶已被广泛报道,包括底物动力学、底物多样性、最适反应条件等^[5-6];然而对乳杆菌的果糖苷酶报道还很少。

本实验室的前期研究发现植物乳杆菌 ST-Ⅲ具有良好的利用低聚果糖的能力。为了研究其代谢低聚果糖的机理,本实验将其果糖苷酶基因克隆到大肠杆菌中,构建了果糖苷酶基因重组菌。之后对其表达条件进行研究,以期得到良好的酶活及较高的表达量,从而为进一步了解乳酸菌的代谢低聚果糖状况,选择合适的益生元、益生菌组合奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

植物乳杆菌 ST-Ⅲ(*Lactobacillus plantarum* ST-Ⅲ)由本实验室保藏;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 及亚克隆载体 pGEM[®]-T Easy 购自美国 Promega 公司;大肠杆菌 BL21(DE3)及克隆载体 pET-28a(+) 购自美国 Novagen 公司;T4 连接酶、

收稿日期:2013-10-16 * 通讯联系人

作者简介:陈臣(1982-),男,博士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:科技部“十二五”国家科技支撑计划课题(2013BAD18B01);科技部“十二五”国家 863 课题(2011AA100901)。

相关限制性内切酶以及 DNA Marker 购自日本 Takara 公司;抗生素、蛋白质 Marker、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、质粒小提试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒等 购自天根生化科技(北京)有限公司;MRS (Man-Rogosa-Sharpe) 培养基 购自德国 Merck 公司;LB 培养基 购自北京陆桥有限公司;果糖测定试剂盒 购自美国 BioVision 公司;亲和层析凝胶 (Sephacrose Fast Flow) 购自美国 GE 公司;低聚果糖纯品 购自日本和光纯药公司;其他试剂均为分析纯。

Whitley A35 厌氧工作站 英国 Don Whitley Scientific 公司;Veriti Thermal Cycler 96-well PCR 仪 美国 Applied Biosystems 公司;Gel Doc XR+凝胶成像仪 美国 Bio-Rad 公司;4700 蛋白组分析系统 美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组表达质粒的构建 参考已经报道的 β -呋喃果糖苷酶基因,在植物乳杆菌 ST-III 基因组 (Genebank number: NC_014554.1) 找到植物乳杆菌果糖苷酶基因 *SacA* (YP_003923471.1), 大小为 1506bp。根据其设计引物 SacAF: GGAATTCCATATGGAGCTCATCGTCATGATATGGAAT; SacAR: CCGCTCGAGCCGCTAGCTTCGCA ACATC (分别引入 *NdeI* 和 *XhoI* 酶切位点), 由美国 Invitrogen 生命技术公司合成。以 ST-III 基因组为模版, 进行 PCR 反应, PCR 体系为 25 μ L: 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, dNTP Mix 2 μ L, 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, 0.2 μ L Taq DNA 聚合酶, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 回收纯化目的条带。将已纯化的目的基因片段在 T4 连接酶的作用下连接至 pGEM[®]-T Easy 载体上, 连接体系、连接条件参考 T4 连接酶说明书。将连接产物电转化至大肠杆菌 DH5 α , 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 并进行 PCR 鉴定及测序鉴定。抽提含有正确插入片段的重组质粒 pGEM[®]-T Easy-sacA, 与表达质粒 pET-28a(+) 进行双酶切 (*NdeI*, *XhoI*), 酶切体系参照限制性内切酶说明书, 回收纯化酶切产物, 4 $^{\circ}$ C 过夜连接。连接产物转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 涂布于含有硫酸卡那霉素的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养 16h, 筛选阳性克隆并进行测序鉴定, 得到正确的目标重组表达载体, 将其命名为 pET-28a(+)-*sacA*, 相应的重组菌命名为 *E.coli* BL21-*sacA*。

1.2.2 目的蛋白的诱导表达 取鉴定为正确克隆的 *E.coli* BL21-*sacA* 过夜培养液, 接种至 200mL 含有卡那霉素 LB 培养基中, 接种量为 1%, 培养温度 37 $^{\circ}$ C, 摇床振荡速率为 200r/min, 在 OD₆₀₀ = 0.6 左右时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C, 诱导 3h。各取诱导前与诱导后 1mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C, 10000 $\times$ g, 离心 10min, 收集菌体细胞, 添加等体积的 2 $\times$ 还原型电泳上样缓冲液重悬细胞, 沸水煮 5min, 上样, 12% SDS-PAGE 分析全细胞中重组蛋白 SacA 的表达情况。

1.2.3 重组蛋白的可溶性诱导表达条件的优化 在

上述条件的基础上, 我们对 IPTG 终浓度 (0.1、0.2、0.5mmol/L) 和诱导的温度 (16、20、25、30 $^{\circ}$ C), 诱导时间 (4、8、12h) 进行优化。诱导终止后, 取 1mL 菌液 600nm 波长下测定菌密度 (OD₆₀₀), 其余菌液混匀, 于 4 $^{\circ}$ C, 10000r/min 离心 10min, 收集菌体细胞。按照每克湿菌体加入 5mL 细胞裂解缓冲液 (含 50mmol/L Tris-HCl (8.0), 300mmol/L NaCl 和 10mmol/L 咪唑) 重悬菌体细胞, 进行超声破碎。破碎条件如下: 超声 300W, 超声 2s, 间歇 8s, 作用 10min, 整个过程于冰浴中进行。细胞破碎液于 4 $^{\circ}$ C, 16000 $\times$ g 离心 20min, 分别收集上清和沉淀, 12% SDS-PAGE 分析目标蛋白的可溶性表达情况。每个样品做三个摇瓶, 实验结果用平均值 $\pm$ 标准差来表示。

1.2.4 蛋白纯化 将最优化条件下的菌体细胞加入细胞裂解缓冲液重悬细胞后, 加入溶菌酶至 1mg/mL, PMSF 至终浓度 1mmol/L, 冰浴 30min。超声破碎后, 加入 Rnase 至 10 μ g/mL, Dnase 至 5 μ g/mL 混匀, 冰浴 30min 后, 4 $^{\circ}$ C, 12000 $\times$ g 离心 30min, 上清入螯合有 NiSO₄ 的 Sepharose Fast Flow 凝胶上, 混匀, 4 $^{\circ}$ C, 摇动 1.5h。然后 4 $^{\circ}$ C, 3500 $\times$ g 离心 2min 弃去上清, 其余重新混匀, 装入亲和层析柱后用 10 倍体积的洗涤溶液 (含 50mmol/L Tris-HCl (8.0), 300mmol/L NaCl 和 20mmol/L 咪唑) 洗去杂蛋白后, 不同浓度的洗脱缓冲液 (含 50mmol/L Tris-HCl (8.0), 300mmol/L NaCl 和不同浓度的咪唑) 梯度洗脱目标蛋白, 取 50 μ L 洗脱液与 50 μ L 2 $\times$ 上样缓冲液混合, 用以蛋白电泳分析。合并纯化蛋白浓度较高的洗脱液, 用 1000 倍体积的 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0, 含 20% 甘油) 4 $^{\circ}$ C 透析 24h, 冻干备用。

1.2.5 MALDI TOF/TOF 质谱检测蛋白质肽谱 按照 Falkner J A 等的方法, 上 4700 蛋白组分析系统选用正离子反射模式对目的蛋白进行质谱解析^[7]。

1.2.6 SDS-PAGE 电泳 按照 Laemmli^[8] 的方法进行, 采用 5% 的浓缩胶和 12% 分离胶进行跑胶; 电泳完后, 用考马斯亮蓝染色液于室温染色 2h 后, 用脱色液脱色至蛋白条带清晰。通过凝胶成像仪灰度扫描电泳胶板, 分析蛋白分布与浓度。

1.2.7 蛋白浓度测定 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 以牛血清蛋白 (BSA) 为标准蛋白绘制标准曲线。见参考文献^[9]。

1.2.8 酶活测定 β -呋喃果糖苷酶测定以蔗糖三糖为底物, 体系包括: 50 μ L 20mmol/L 蔗糖三糖, 50 μ L 50mmol/L PBS (pH6.0), 15 μ L 酶液 (11 μ g/mL), 用水补足体积 200 μ L。混匀后 37 $^{\circ}$ C 左右 10min, 后 100 $^{\circ}$ C 水浴 5min。产生的果糖通过果糖测定试剂盒进行检测。 β -呋喃果糖苷酶酶活定义: 在 37 $^{\circ}$ C, pH6.0 条件下, 每分钟水解蔗糖三糖产生 1 μ mol 果糖定义为一个单位。并通过测定蛋白质含量计算酶的比酶活。

2 结果与讨论

2.1 *sacA* 基因的克隆

参考已经报道的果糖苷酶基因, 寻找植物乳杆菌的果糖苷酶基因 (YP_003923471.1), 该基因大小为 1506bp, 编码 501 个氨基酸。通过 BLAST 程序与

NCBI 上其他果糖苷酶相比较, *sacA* 与其他植物乳杆菌的果糖苷酶保持极高的同源相似性 (>98%), 但与其他乳酸菌来源的果糖苷酶相似度较低 (<78%)。值得注意的是, 该酶与片球菌属 (*Pediococcus*) 的蔗糖-6-磷酸水解酶相似度达 99%, 推测该基因有可能通过水平转移从片球菌属中获得^[10]。以 ST-III 基因组作为模板, 用 SacAF 和 SacAR 为引物进行 PCR 扩增反应, 得到 1.5kb 左右的基因片段, 大小与预期一致, 结果如图 1 泳道 1 所示。将扩增后回收纯化的 PCR 产物片段与 pGEM®-T Easy 载体连接, 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 构建克隆载体 pGEM®-T Easy-*sacA*, 并通过测序和酶切验证。如图 1 泳道 2 所示, 其琼脂糖凝胶电泳显示有 1.5kb 和 3kb 的两个酶切片段, 说明目的片段已插入 pGEM®-T Easy 载体。

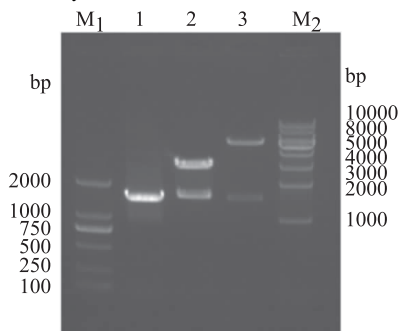


图 1 目的基因扩增及构建载体的双酶切鉴定

Fig.1 PCR amplification of the gene *sacA* and restriction enzyme analysis of recombinant

注: M₁, DL 2000 Marker; 1, 目的基因 *SacA* PCR 扩增产物;

2, pGEM®-T Easy-*sacA* 经 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切;

3, pET-28a(+) -*sacA* 经 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切; M₂, 1kb ladder

将克隆载体 pGEM®-T Easy-*sacA* 用限制性内切酶 *NdeI* 和 *XhoI* 酶切产物与对应双酶切载体 pET-28a(+) 进行连接, 构建表达载体 pET-28a(+) -*sacA*。将重组质粒连接产物转化至 *E.coli* BL21 (DE3), 37℃ 平板培养 24h, 挑选阳性转化子接种至 LB 液体培养基中培养过夜, 离心收集菌体, 提取重组质粒, 用对应的限制性内切酶对重组质粒进行鉴定。pET-28a(+) -*sacA* 经 *NdeI* 和 *XhoI* 双酶切, 得到 5kb 的 pET28a(+) 线性片段和 1.5kb 的目的基因片段, 如图 1 泳道 3 所示, 证明表达载 pET-28a(+) -*sacA* 成功转入 *E.coli* BL21 (DE3) 宿主菌中。将阳性表达宿主命名为 *E.coli* BL21-*sacA*。

2.2 重组蛋白的表达与鉴定

将未诱导、诱导的重组菌破壁后分别取上清和沉淀利用 SDS-PAGE 检测发现 (图 2), 经 IPTG 诱导后得到一条大小为 66ku 的条带, 比理论值偏大约 6ku。为了验证表达蛋白是否为 *SacA* 酶, 重组蛋白经切胶纯化后, 用胰酶酶解, 对其酶解的肽段进行质谱检测, 见图 3。酶解片段中发现 10 个片段与 *SacA* 蛋白序列相一致, 占蛋白序列全长的 21%; 该蛋白 Mascot score 数值达到 96 (>86 差异显著)^[11], 表明 *sacA* 基因在 *E.coli* BL21 (DE3) 中成功表达。

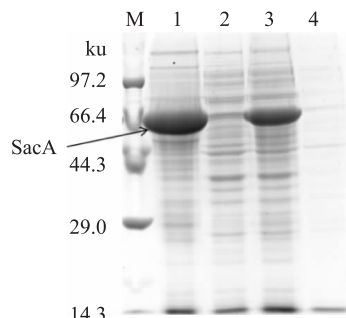


图 2 重组蛋白表达鉴定

Fig.2 Expression identification of the aimed recombinant *SacA* enzyme

注: M, 蛋白 Marker; 1, 2, 3 分别为 *E.coli* BL21-*sacA*

诱导后菌体全细胞, 细胞破碎上清和沉淀;

4, *E.coli* BL21-*sacA* 诱导前菌体全细胞。

1	MGSSHHHHHH	SSGLVPRGSH	MELIVMIWNR	KTRYTPYEQW	PATKLPQLVA
51	QARQSKWRMQ	HHIQPTSGLL	NDPNGFSYFD	GQWHLFYQVF	PFGPVHGLKS
101	WQHVTSKNLV	DWHDEGLAIR	PDPYDSHGA	YTGALPIDD	QLFIMYTGTV
151	RTADWQRESY	QLGAWMDTDN	HIKKLSRPLI	AHAPAGYTSS	FRDPDLIRTD
201	HGYALIGAQA	TTTEIGAILV	YFSKDLTWT	CQELNVPAN	ARGYMIIECPN
251	LVWIDQQPVL	LFCPQGLSQT	TFPYQNIYPN	MYLVADQLDL	AQAQFTERHA
301	LTQLDDGFDV	YATQAINAPD	GRALAVSWIG	LPEISYPTDR	ENWAHCLSLV
351	KELTLKDGHL	YQNPVAAVDD	LRTTAHDLVF	EQQRATVAAL	NGSFELLTIV
401	PADKTVTVNI	ADQESGQLQ	VTVDANHGQV	MIDRRHTGNS	FAEDYGQTRQ
451	VELTAHKTIK	IRLIIDVSVF	ECYIDNGYSV	MTGRFFLNAT	PSRLNVQGDT
501	TAVTGKVVWEW	RQSEHTGVND	NETKIK		

图 3 MALDI TOF/TOF 质谱检测蛋白质肽谱与 *SacA* 蛋白序列的比对

Fig.3 The alignment of sequences of polypeptide chain fragments (identified by MALDI TOF/TOF mass spectrometry analysis) with the deduced amino acid sequence of the recombinant β -fructofuranosidase in *E.coli*

注: 加粗片段为液质联用得到的肽段;

下划线片段为表达载体 pET-28a(+) 引入的肽段

2.3 重组蛋白的表达优化

图 2 表明, 在 IPTG 终浓度为 1mmol/L, 37℃, 诱导 3h 表达的重组蛋白主要位于胞内不溶性物质中, 表明蛋白在胞内形成包涵体。为提高目标蛋白的可溶性表达水平, 我们对诱导条件进行了优化, 并分别采用 SDS-PAGE 电泳图和生物量、酶活做为表征。诱导剂 IPTG 浓度在 0.1~2.0mmol/L 之间时, 目标蛋白的表达水平相差不大 (结果未列出), 为节省成本, 选择 0.1mmol/L IPTG 进行诱导表达实验, 结果见图 4、图 5 和表 1。实验发现, 在 30、25℃ 培养时, 重组蛋白主要以包涵体的形式存在, 16、20℃ 主要以可溶性蛋白存在, 这主要是因为较高的诱导温度, 细菌的新陈代谢增加, 外源蛋白的合成速度也加快了, 使大量蛋白来不及转运和正确折叠, 只能以包涵体的形式存在^[12]。20℃ 时背景蛋白的表达量较 16℃ 高, 为了便于纯化故选择 16℃ 进行诱导表达。在该培养温度下, 单位细胞的生物量与酶活在 2~12h 内随诱导时间的延长而增加, 继续延长诱导时间, 14h 后背景蛋白的表达量开始上升, 比酶活略有降低。因此, 为平衡目标蛋白的表达总量与纯度, 确定诱导时间为 12h。在最优化的表达条件下 (0.1mmol/L IPTG, 16℃, 诱导 12h), 目标蛋白 70% 以上是以可溶的形式表达 (见图 4 泳道 10, 11 和 12)。

表1 在不同的诱导条件下 *E.coli* BL21-*sacA* 的生长情况及其细胞破碎上清的比酶活力Table 1 The biomass of *E.coli* BL21-*sacA* and the specific activity of its soluble cytoplasmic fraction induced at different conditions

实验编号	IPTG(mmol/L)	培养温度(℃)	培养时间(h)	生物量(OD ₆₀₀)	比酶活(U/mg)
1	0.1	30	4	2.63 ± 0.09	0.13 ± 0.01
2	0.1	25	6	2.55 ± 0.06	0.17 ± 0.02
3	0.1	20	8	2.67 ± 0.11	0.20 ± 0.02
4	0.1	16	2	0.95 ± 0.05	0.54 ± 0.04
5	0.1	16	4	1.24 ± 0.07	0.97 ± 0.06
6	0.1	16	6	1.63 ± 0.08	1.54 ± 0.08
7	0.1	16	8	1.96 ± 0.09	2.44 ± 0.11
8	0.1	16	10	2.38 ± 0.13	3.22 ± 0.13
9	0.1	16	12	2.79 ± 0.15	3.4 ± 0.13
10	0.1	16	14	3.18 ± 0.16	3.23 ± 0.14
11	0.1	16	16	3.55 ± 0.15	3.20 ± 0.12

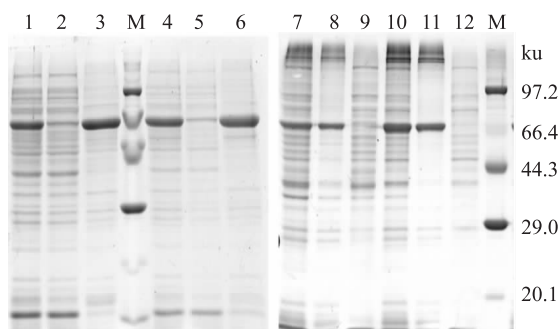


图4 不同培养温度下重组蛋白表达

Fig.4 Expression of the aimed recombinant SacA enzyme at different temperature

注:M,蛋白 Marker;1,2,3 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 30℃ 培养 4h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;
4,5,6 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 25℃ 培养 6h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;7,8,9 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 20℃ 培养 8h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;10,11,12 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 16℃ 培养 12h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀。

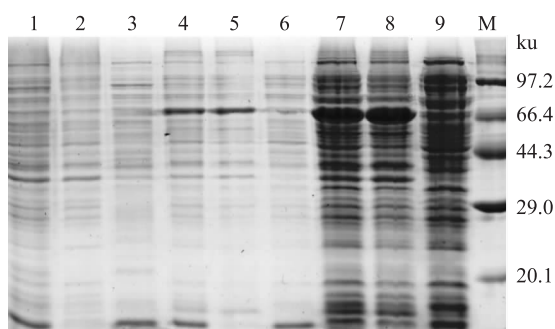


图5 16℃不同培养时间下重组蛋白表达

Fig.5 Expression of the aimed recombinant SacA enzyme at 16℃ with different induction time

注:M,蛋白 Marker;1,2,3 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 16℃ 培养 2h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;
4,5,6 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 16℃ 培养 4h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;
7,8,9 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 16℃ 培养 8h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀;
10,11,12 分别 *E.coli* BL21-*sacA* 诱导后 16℃ 培养 16h 菌体全细胞,细胞破碎上清和沉淀

2.4 重组蛋白的分离纯化

重组蛋白因带有 6 × His 标签可被特异性地吸附至亲和介质(Ni²⁺)上从而与杂蛋白迅速分离^[13]。低浓度的咪唑能起到去除杂蛋白并纯化蛋白的作用,而与介质亲和力的强的重组蛋白能在高浓度的咪唑作用下洗脱下来。由 *E.coli* BL21-*sacA* 表达的重组蛋白 SacA 带有 6 × His 标签,故可用 Ni²⁺ 亲和柱纯化。见图 6,在吸附缓冲液中添加终浓度 50mmol/L 咪唑,即可以去除大部分的杂蛋白,使得重组蛋白最大限度地吸附到填料上;之后采用梯度浓度洗脱目标蛋白,300mmol/L 浓度的咪唑能完全洗脱亲和填料上目标蛋白。将咪唑洗脱蛋白用 1000 倍体积的 50mmol/L Tris-HCl 透析去除咪唑,冻干后约从 1L 发酵液中获得 120mg 纯化的 SacA 蛋白,比酶活达 107.0U/mg。

3 结论

β-呋喃果糖苷酶是水解低聚果糖的关键酶,对于乳杆菌等有益菌在肠道中生存至关重要。为了了

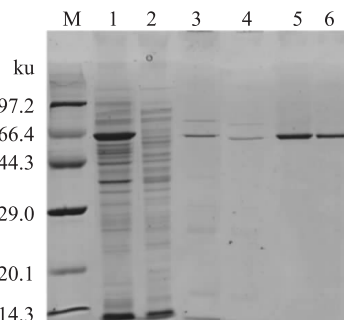


图6 SDS-PAGE 分析目的蛋白的梯度洗脱纯化

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

注:M,蛋白 Marker;1,*E.coli* BL21-*sacA* 诱导后细胞破碎上清;2,50mmol/L 咪唑洗脱;3,100mmol/L 咪唑洗脱;4,150mmol/L 咪唑洗脱;5,250mmol/L 咪唑洗脱;6,300mmol/L 咪唑洗脱

解植物乳杆菌利用低聚果糖的机理,本研究根据已经报道的果糖苷酶基因,以植物乳杆菌 ST-III 为模版将 β-呋喃果糖苷酶基因 *sacA* 克隆到载体 pET-28a

(+)上,转化后构建出重组子 *E.coli* BL21-*sacA*,并探讨了适宜的培养条件:37℃培养重组大肠杆菌至 OD₆₀₀ 0.6 左右,16℃用 0.1mmol/L IPTG 诱导 12h,比酶活达到 3.4U/mg。亲和层析纯化后,纯化的 SacA 蛋白含量为 0.12g/L,比酶活达 107.0U/mg。与野生型菌株相比,重组大肠杆菌 β-呋喃果糖苷酶的表达量高,易于大规模发酵及纯化,为 β-呋喃果糖苷酶在基因水平上的研究及改造提供了经验及信息。

参考文献

- [1] Gibson G R, Roberfroid M B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics [J]. *J Nutr*, 1995, 125 (6): 1401-1412.
- [2] Niness K R. Inulin and oligofructose; what are they? [J]. *J Nutr*, 1999, 129 (7): 1402-1406.
- [3] Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities [J]. *Biochem J*, 1991, 280 (2): 309-316.
- [4] Martel C M, Warrilow A G, Jackson C J, et al. Expression, purification and use of the soluble domain of *Lactobacillus paracasei* beta-fructosidase to optimise production of bioethanol from grass fructans [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (12): 4395-4402.
- [5] Jedrzejczak - Krzepkowska M, Tkaczuk K L, Bielecki S. Biosynthesis, purification and characterization of β-fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1 [J].

Process Biochem, 2011, 46 (10): 1963-1972.

- [6] Omori T, Ueno K, Muramatsu K, et al. Characterization of recombinant beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1 [J]. *Chem Cent J*, 2010 (4): 9.
- [7] Falkner J A, Kachman M, Veine D M, et al. Validated MALDI-TOF/TOF mass spectra for protein standards [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2007, 18 (5): 850-855.
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976 (72): 248-254.
- [10] Naumov D G, Livshits V A. Molecular structure of the locus for sucrose utilization by *Lactobacillus plantarum*; comparison with *Pediococcus pentosaceus* [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2001, 35 (1): 19-27.
- [11] Koenig T, Menze B H, Kirchner M, et al. Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2008, 7 (9): 3708-3717.
- [12] 杨炼, 张艳红, 丁虎生, 等. 抗黄曲霉毒素 B1 单链抗体在大肠杆菌中的表达及优化 [J]. *微生物学报*, 2009 (7): 880-888.
- [13] 陈爱春, 彭伟, 汪生鹏. 亲和标签在重组蛋白表达与纯化中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2012 (12): 93-103.

(上接第 154 页)

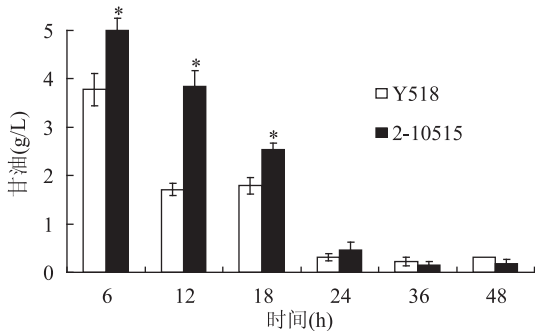


图8 发酵过程中 Y518 和 2-10515 的甘油产量比较

Fig.8 Glycerol production of Y518

and 2-10515 at different fermentation time

Y518 进行了初步的生理生化研究,发现与原始菌株 2-10515 相比, Y518 在生理和代谢上发生了显著变化,而且其呼吸存在缺陷。这些数据不仅为接下来的代谢和转录组等方面研究提供实验依据,也为以后的发酵条件改进提供指导。

参考文献

- [1] 陈叶福, 李军侠, 沈世超, 等. 酿酒酵母谷胱甘肽产量与镉盐抗性关系的研究与应用 [J]. *中国酿造*, 2012, 31 (4): 40-43.
- [2] 鲍晓明, 高东. 酵母菌呼吸缺陷型的选育 [J]. *华中农学院学报*, 1984, 3 (2): 44-47.
- [3] 王莉, 阳蕾. 啤酒酵母呼吸缺陷型菌株的检测 [J]. *啤酒科*

技, 2002, 2: 10-12.

- [4] Viktor K, Margita O, Jitka U, et al. Induction of respiration-deficient mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by chelerythrine [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 120: 87-92.
- [5] 王继花, 薛永常, 高圣, 等. 高渗透胁迫下啤酒酵母的生理特性研究 [J]. *中国酿造*, 2008, 5: 45-47.
- [6] 王雅楠, 梅艳珍, 郑丽雪, 等. 酵母突变株 Y518 谷胱甘肽合成酶结构分析 [J]. *食品科学*, 2009, 30 (17): 258-261.
- [7] 江洁, 卜红宇. 酿酒酵母菌产谷胱甘肽的发酵条件研究 [J]. *中国酿造*, 2009, (1): 59-61.
- [8] 吴小映, 李慧萍, 何春燕, 等. 呼吸缺陷型酵母发酵性能研究 [J]. *啤酒科技*, 2007, 4: 18-21.
- [9] 赵炯. 中药抗真菌活性测定和酵母利用非发酵碳源基因的筛选 [D]. 天津: 天津大学, 2007.
- [10] 舒馨, 刘雄民, 梁秋霞, 等. 3,5-二硝基水杨酸吸光光度法测定八角残渣中总糖、还原糖含量 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31 (6): 341-343.
- [11] Alois H, Robert W, Arek N, et al. Comparison of yeast cell protein solubilization procedures for two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis* 1999, (20): 826-829.
- [12] 袁文杰, 孔亮, 孜力汗, 等. 高效液相色谱法测定克鲁维酵母芽发液中的乙醇、糖和有机酸类代谢成分 [J]. *分析化学*, 2009, 37 (6): 850-854.
- [13] 陈献忠, 王正祥, 诸葛健. 酵母细胞甘油代谢与生理功能研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30 (5): 140-148.