

• 食品生物技术 •

菊糖蔗糖酶的性质鉴定及菊糖的酶法合成

倪大伟¹, 徐炜¹, 陈自卫¹, 张文立^{1,2}, 沐万孟^{1,2}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品安全国际合作联合实验室, 江苏 无锡 214122

倪大伟, 徐炜, 陈自卫, 等. 菊糖蔗糖酶的性质鉴定及菊糖的酶法合成. 生物工程学报, 2021, 37(1): 266-275.

Ni DW, Xu W, Chen ZW, et al. Characterization of inulosucrase and the enzymatic synthesis of inulin. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 266-275.

摘要: 菊糖作为益生元和膳食纤维, 具有许多重要的生理功能, 广泛应用于食品、医药等领域。微生物菊糖蔗糖酶可以以蔗糖为底物合成较植物菊糖具有更高分子量的菊糖。文中通过基因数据库筛选获得一段拟表达菊糖蔗糖酶的基因。通过 N-端和 C-端截断的方式, 保留中间催化域, 构建重组质粒。将重组质粒在大肠杆菌表达系统中表达, 粗酶液经 Ni²⁺亲和和层析纯化, 获得分子量约为 65 kDa 的重组酶。以蔗糖为唯一底物时, 重组酶的最适 pH 和温度分别为 5.5 和 45 °C。金属离子在不同程度上抑制酶的活性。产物多糖分离纯化后, 使用核磁共振鉴定产物多糖为 β -(2,1)糖苷键连接的菊糖。最后对菊糖合成的条件进行优化, 结果表明: 以 700 g/L 的蔗糖为底物, 加酶量 4 U/mL 时, 7 h 后菊糖产量达到最大, 约为 287 g/L, 蔗糖到菊糖的转化率约为 41%。

关键词: 菊糖蔗糖酶, 酶学性质, 菊糖, 酶法合成

Characterization of inulosucrase and the enzymatic synthesis of inulin

Dawei Ni¹, Wei Xu¹, Ziwei Chen¹, Wenli Zhang^{1,2}, and Wanmeng Mu^{1,2}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: As a type of prebiotics and dietary fiber, inulin performs plenty of significant physiological functions and is applied in food and pharmaceutical fields. Inulosucrase from microorganisms can use sucrose as the substrate to synthesize inulin possessing higher molecular weight than that from plants. In this work, a hypothetical gene coding inulosucrase was selected from the GenBank database. The catalytic domain was remained by N- and C- truncation strategies, constructing the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* expression system, and after purifying the crude enzyme by Ni²⁺ affinity chromatography, a recombinant enzyme with a molecular weight of approximately 65 kDa was obtained. The optimal pH and temperature of the recombinant enzyme were 5.5 and 45 °C, respectively, when sucrose was

Received: April 22, 2020; **Accepted:** August 2, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31922073, 31801583), Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20181343).

Corresponding author: Wanmeng Mu. Tel/ Fax: +86-510-85919161; E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31922073, 31801583), 江苏省自然科学基金 (No. BK20181343) 资助。

网络出版时间: 2020-08-13

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200812.1103.015.html>

used as the sole substrate. The activity of this enzyme was inhibited by various metal ions at different degrees. After purifying the produced polysaccharide, nuclear magnetic resonance analysis was used to determine that the polysaccharide was inulin connected by β -(2,1) linkages. Finally, the conditions for the production of inulin were optimized. The results showed that the inulin production reached the maximum, approximately 287 g/L after 7 h, when sucrose concentration and enzyme dosage were 700 g/L and 4 U/mL, respectively. The conversion rate from sucrose to inulin was approximately 41%.

Keywords: inulosucrase, enzymatic properties, inulin, enzymatic synthesis

微生物多糖是一类重要的微生物多聚物^[1], 其中微生物胞外多糖在食品领域中的研究和应用较为广泛。果聚糖和葡聚糖是两种重要的同多糖。按照果糖基之间的糖苷键型分类, 果聚糖可分为 β -(2,1) 糖苷键连接的菊糖和 β -(2,6) 糖苷键连接的 levan 型果聚糖^[2]。菊糖在植物中, 尤其是菊科植物中含量丰富。目前, 工业化生产和应用的菊糖均来自植物提取, 主要原料为菊苣和菊芋等^[3]。相反, levan 型果聚糖 (以下简称 levan) 在植物中含量极少, 因此, levan 的生产 and 应用主要通过微生物酶法合成^[4]。

微生物中存在一类以蔗糖为底物, 经一步反应合成多糖的酶, 统称为“蔗糖类酶”^[5]。合成 levan 的 levan 型果聚糖蔗糖酶 (Levansucrase, LS) 和合成菊糖的菊糖蔗糖酶 (Inulosucrase, IS) 是其中的典型代表, 分别可以以蔗糖为唯一底物, 合成 levan 和菊糖。菊糖具有良好的理化性质, 如水溶性、增稠性和凝胶性等, 常被作为低能量甜味剂、增稠剂、脂肪替代品和质构修饰剂等, 应用于食品领域^[6-8]。菊糖的 β -(2,1) 糖苷键不能被人体的消化酶水解, 能到达盲肠, 被乳酸菌和双歧杆菌发酵, 从而促进肠道有益菌的生长^[9]。一直以来, 菊糖被视为一种可溶性膳食纤维和益生元, 具有许多重要的生理功能, 如: 促进钙离子吸收、缓解炎症反应、减少肿瘤发生风险和抗氧化等^[10]。微生物菊糖与植物菊糖相比, 最大的区别在于微生物菊糖的分子量较高, 一般可达 10^6 - 10^8 g/mol, 而植物菊糖一般不超过 10^4 g/mol^[11]。

近年来, 由于高分子量菊糖的合成能力, IS 受到关注。目前, 已鉴定的具有 IS 生产能力的微生物有 15 种, 其中只有 7 个 IS 被鉴定出了酶学性

质, 1 个 IS 被解析出了晶体结构^[11]。IS 生产的高分子量菊糖比植物菊糖在凝胶性能和稳定性等方面有着较大优势^[12]。IS 在菊糖纳米材料的制备和应用方面的研究也不断增多^[13]。IS 和 LS 同属于糖苷水解酶 GH68 家族 (<http://www.cazy.org/GH68.html>), 亲缘关系密切。二者已报道的酶学性质、结构功能和催化机理等方面具有很多的相似之处, 故常被一起研究和讨论^[2, 14]。本研究利用 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中鸚鵡热乳杆菌 *Lactobacillus psittaci* DSM 15354 的假定编码 IS 的基因序列为基础, 通过 N-端截断和 C-端截断的方式, 构建重组质粒。将重组质粒在大肠杆菌 *Escherichia coli* 表达系统中异源表达, 经分离纯化后, 进行酶学性质鉴定及产物结构鉴定。之后对酶法合成菊糖的条件进行优化。该研究为菊糖的酶法合成提供理论基础, 对促进高分子量菊糖的研究有一定意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)、氨苄青霉素钠 (Amp)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、果糖、葡萄糖、蔗糖、酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 基因合成及质粒构建委托上海捷瑞生物工程有限公司完成; 标准蛋白 Marker、染色和脱色相关试剂购自上海雅酶生物科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

pH 计 (FE22, 梅特勒-托利多)、高压灭菌锅

(GI54DWS, 美国 Zealway)、紫外检测器 (HD-3, 上海沪西分析仪器厂有限公司)、超声波细胞破碎仪 (SCIENTZ-1200E, 宁波新芝生物科技股份有限公司)、 Ni^{2+} 亲和层析填料 (Ni^{2+} Sepharose 6 Fast Flow, GE Healthcare)、核磁共振波谱仪 (AVANCE III 400 MHz, 德国布鲁克 AXS 有限公司)、高效液相色谱仪 (e2695)、示差折光检测器 (2414)、柱温箱 (WAT038040)、色谱柱 (Sugar-PakTM) 为美国沃特世公司 (Waters) 产品。

1.3 方法

1.3.1 重组酶的克隆、表达及纯化

通过 NCBI 数据库检索, 发现来源于 *L. psittaci* DSM 15354 的一段基因序列, 登录号: AZFB01000009.1, 标注为 LS 的编码序列。将其 5'-端和 3'-端分别截断 273 bp 和 324 bp, 保留中间 1 701 bp 的序列。在目的基因的 5'-端和 3'-端分别加上限制性酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I, 并在 3'-端加上 6 个组氨酸标签序列。将重组序列连接到载体 pET-22b(+) 上, 构建重组质粒: Laps-pET-22b(+). 将其转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中进行蛋白表达。

重组 *E. coli* 在 LB 液体培养基 (5 g/L 酵母提取物, 10 g/L 蛋白胨、10 g/L NaCl) 中表达蛋白。LB 液体培养基中含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Amp, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 当培养物 OD_{600} 达到 0.6 时, 向培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG。将培养基置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下, 诱导重组酶的过量表达。7 h 后离心收集菌体。

将由 200 mL 培养基中收集的菌体, 用细胞裂解液 (50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 100 mmol/L NaCl, pH 7.0) 充分悬浮。置于冰上, 利用超声波细胞破碎机进行破碎 (工作 1 s、停 2 s、总时长 20 min、30% 功率)。将细胞破碎液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.45 μm 的水系膜过滤, 收集滤液。利用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化目的蛋白。首先利用上样缓冲液 (50 mmol/L 磷酸

盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5) 平衡 Ni^{2+} 柱, 之后将过膜粗酶液泵入柱中, 再用上样缓冲液洗脱未结合的蛋白。然后用去杂蛋白缓冲液 (50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 50 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5) 洗脱弱结合的杂蛋白。最后用洗脱缓冲液 (50 mmol/L 磷酸盐缓冲液、500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5) 收集目的蛋白, 收集时间根据紫外检测器的出峰时间而定, 整个过程恒流泵的流速控制在 3 mL/min。收集的酶液于 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中透析 3 次。收集透析后的酶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定蛋白分子量, 上层胶浓度为 4.5%, 下层胶浓度为 12.5%。染色 1 h, 脱色至背景透明。使用 Bradford 法测量纯化后蛋白浓度^[15]。使用 ExPASy 在线服务器预测 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 蛋白理论分子量。

1.3.2 酶活分析

1 mL 的反应体系中, 含 300 g/L 的蔗糖和 50 mmol/L 的醋酸盐缓冲液 (pH 5.5)。反应体系在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下预热 2 min, 加入 10 μg 重组酶, 反应 20 min。反应结束后, 加入终浓度为 100 mmol/L 的 NaOH, 冰浴 20 min 使酶失活, 加入等量 HCl 中和反应体系。以蔗糖为唯一底物时, 定义总酶活、水解酶活和转糖基酶活 3 种酶活力。其中反应体系中葡萄糖的量代表总酶活; 果糖的量代表水解酶活; 二者之差代表转糖基酶活。酶活的定义为: 以 300 g/L 蔗糖为唯一底物时, 每分钟释放 1 μmol 的单糖 (葡萄糖或果糖) 所需要的酶量。

反应体系中糖含量检测使用高效液相色谱 (HPLC) 和示差折光检测器进行。色谱柱型号为 Sugar-Pak I (6.5 mm \times 300 mm)。流动相为超纯水, 流速 0.4 mL/min, 柱温 85 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.3 pH 对酶活的影响

使用 50 mmol/L 的 3 种不同的缓冲液, 测定酶活的变化。分别为醋酸盐缓冲液 (pH 4.0–6.5)、

磷酸盐缓冲液(pH 6.5–7.5)和 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0)。反应温度为 45 °C, 反应时间为 20 min。其余条件如 1.3.2 所述。

1.3.4 温度对酶活的影响

将反应体系置于不同的温度下进行反应, 研究温度对酶活的影响。温度设为 25–60 °C, 间隔 5 °C。缓冲液为 pH 5.5 的醋酸缓冲液, 反应时间为 20 min。其余条件如 1.3.2 所述。

1.3.5 金属离子对酶活的影响

向反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 的 CoCl₂、CaCl₂、MgSO₄、NiSO₄、MnSO₄、CuSO₄、FeSO₄、ZnSO₄、Fe₂(SO₄)₃、Al₂(SO₄)₃ 和 EDTA, 于 pH 5.5 和 45 °C 条件下反应 20 min。其余条件如 1.3.2 所述。未加金属离子的对照组酶活定义为 100%。

1.3.6 产物多糖的分离纯化

扩大反应体系至 100 mL, 其中蔗糖浓度 700 g/L, 加酶量 4 U/mL, 在 pH 5.5 和 45 °C 条件下反应 7 h。反应结束后, 利用 Sevag 法除蛋白。向去除蛋白后的溶液中, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 4 °C 沉淀, 离心取沉淀。用水复溶后重复该步骤, 直至 HPLC 的图谱中显示无蔗糖、葡萄糖和果糖残留。将沉淀冷冻干燥 24 h, 储存于干燥器中。

1.3.7 核磁共振(NMR)

将 35 mg 冷冻干燥的样品, 放进核磁管, 加入 550 μ L 的重水(D₂O), 放在 70 °C 水浴锅中溶解。待完全溶解后, 进行 NMR 检测, 记录碳谱(NMR-¹³C)和氢谱(NMR-¹H)。

1.3.8 酶法合成菊糖的条件优化

为探究底物浓度对菊糖产量的影响, 100、200、300、400、500、600、700、800 g/L 的蔗糖作为底物, 加酶量控制在 4 U/mL, 于 pH 5.5 和 45 °C 条件下反应 20 min。

为探究加酶量对菊糖产量的影响, 向 700 g/L 的蔗糖中分别加入 0.2、0.6、1、2、3、4、5 U/mL 的重组酶, 于 pH 5.5 和 45 °C 条件下反应 20 min。

为探究菊糖产量随时间的变化, 向 700 g/L 的蔗糖中加入 4 U/mL 的重组酶, 分别在反应

0.33、1、2、3、4、5、6、7、8、9 h 后取样检测菊糖含量。

1.3.9 数据分析

本研究中, 酶学性质部分和菊糖合成条件的优化部分, 平行实验 3 次, 数据取平均值, 采用 Origin 8.5 作图。氨基酸序列比对使用 ESPript 在线服务器完成(<http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/>)。NMR-¹³C 和 NMR-¹H 的图谱分析, 使用 MestReNova 软件进行。

2 结果与分析

2.1 重组酶的构建、表达及纯化

NCBI 数据库中有一段可利用的 DNA 序列 (GenBank 登录号: AZFB01000009.1), 其编码的蛋白序列登录号为: KRL62549.1。蛋白全长 765 个氨基酸, N-端前 32 个氨基酸为该酶信号肽, C-端有一段细胞壁结合序列 LPQGTG, 它们的存在影响蛋白的表达纯化。信号肽和细胞壁结合序列在 IS 中是常见的^[16]。通过氨基酸序列比对分析 (图 1), 该蛋白与已知晶体结构的约氏乳杆菌 *Lactobacillus johnsonii* NCC533 来源的 IS (Lajo-IS) 序列一致性达 62.9%, 因此, 推测该蛋白可能是 IS。研究表明 IS 的氨基酸序列可分为 3 部分, 其一: N-端不保守区域; 其二: C-端不保守区域; 其三: 保守催化区域^[17-19]。因此, 本研究采用同时截断 N-端和 C-端部分序列的方式, 构建重组酶。

通过将已知蛋白序列与 Lajo-IS 进行氨基酸比对, 将野生酶 N-端和 C-端多余的 93 个和 108 个氨基酸截断, 相当于在 DNA 序列 5'-端和 3'-端分别截去 273 bp 和 324 bp。将保留的中间 1 701 bp 的 3'-端加上 6 个组氨酸标签后插入到载体 pET-22b(+) 中。构建的重组质粒经表达、分离、纯化后, 进行 SDS-PAGE 检测。如图 2 所示, 重组酶的条带单一, 分子量在 65 kDa 左右, 与蛋白的理论预测值 63.4 kDa 相符, 表明蛋白成功表达。纯化后无杂蛋白残留, 可用于后续酶学性质的鉴定研究。

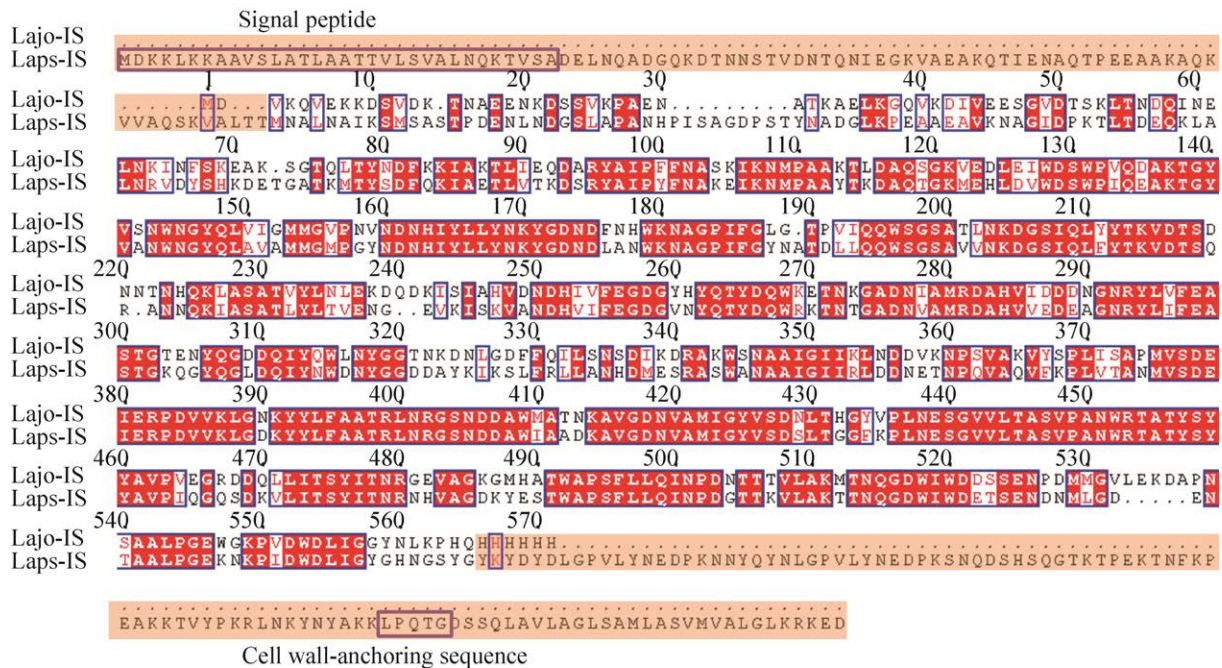


图1 Lajo-IS 和 Laps-IS 的氨基酸序列比对 (红色部分为保守区域, 浅橙色阴影部分为截去的序列)

Fig. 1 Multiple sequence alignment of Lajo-IS and Laps-IS. Red parts are conserved regions and the light orange parts are truncated sequences.

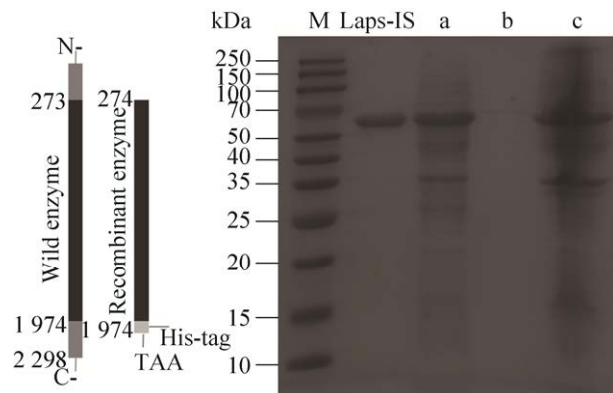


图2 重组酶的构建方式及 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 The constructed process of the recombinant enzyme and SDS-PAGE analysis. M: standard protein marker; Laps-IS: the purified recombinant enzyme; a: the supernatant of broken cells; b: the supernatant cultivating the cells for 6 h; c: the broken cell fragments.

2.2 pH 和温度对酶活的影响

IS 催化蔗糖的反应过程分为 3 步。第 1 步: 在酶的作用下, 蔗糖被裂解为葡萄糖和酶-果糖基复合物。第 2 步: 若水分子作为果糖基受体, 则

发生水解反应, 蔗糖被水解为葡萄糖和果糖; 若另一分子蔗糖作为果糖基受体, 则发生转糖基反应, 果糖基通过 β -(2,1)糖苷键连接到蔗糖的果糖基端, 产生蔗果三糖。第 3 步: 蔗果三糖再次作为受体, 生产蔗果四糖, 反应不断进行, 最终产生生长链菊糖^[11]。因此, 由反应过程定义了 3 种酶活: 总酶活、水解酶活和转糖基酶活, 分别用反应体系中葡萄糖的量、果糖的量和二者之差表示。

pH 对酶活的影响如图 3A 所示。在弱酸性环境下, 酶活处于较高水平, 在 pH 5.5 的醋酸盐缓冲液中总酶活和转糖基酶活达到最大, 水解酶活在 pH 5.0 的醋酸盐缓冲液中最大。碱性环境对酶活的影响大, 3 种酶活均比较低。因此, 重组酶的最适 pH 为 5.5。目前已报到的 IS, 除芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 217C-11 来源的以外^[20], 最适 pH 均在弱酸性条件下。与格氏乳杆菌 *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 来源的 IS 相比^[21], Laps-IS 的酶活受 pH 的影响更加显著。

温度对酶活的影响如图 3B 所示。在 25–45 °C，酶活随着温度的升高而增加，且转糖基酶活的增加幅度比水解酶活大。在 45 °C 时总酶活和转糖基酶活达到最大，而水解酶活在 50 °C 时达到最大。因此，确定 45 °C 为重组酶的最适温度。值得注意的是，在 25 °C 时，转糖基酶活与水解酶活之比(T/H)为 4.0，随着温度的提高，这一比例逐渐降低，45 °C 时 T/H 为 1.7。45–60 °C，T/H 变化不大。这一现象说明，低温条件更有利于发生

转糖基反应，高温条件下则促进水解反应发生。黏琼脂芽孢杆菌 *Bacillus agaradhaerens* WDG185 来源的 IS 的最适温度是目前鉴定的同类酶中最高的，为 60 °C^[22]。其次是 *L. johnsonii* NCC 533 来源的 IS，最适温度为 55 °C^[16]。

2.3 金属离子对酶活的影响

金属离子对酶活的影响如图 4 所示。在添加终浓度为 1 mmol/L 的各种金属离子后，重组酶的酶活均受到不同程度影响。尤其是 Cu^{2+} ，1 mmol/L

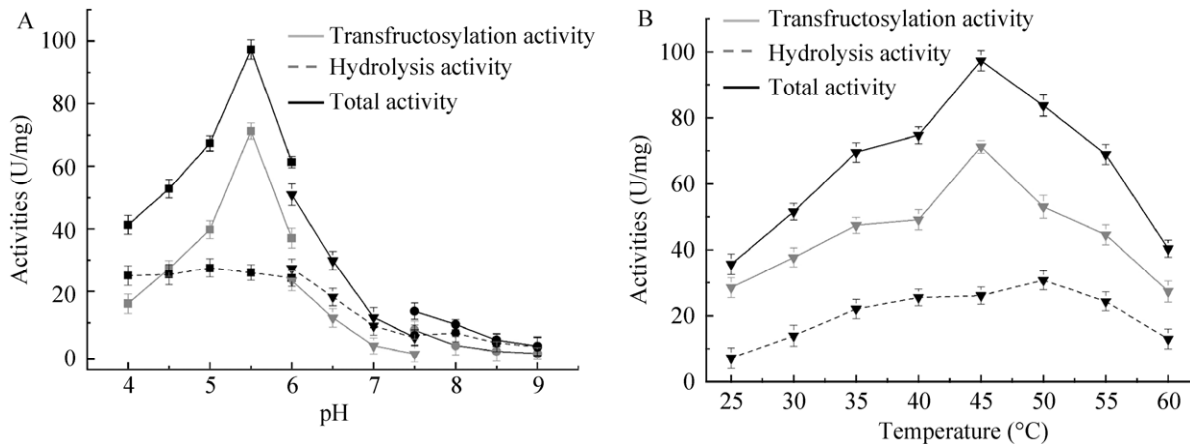


图 3 pH (A) 和温度 (B) 对 Laps-IS 酶活的影响

Fig. 3 The effects of pH and temperature on activities of Laps-IS. (A) The effects of pH on total, hydrolysis and transfructosylation activities. □: acetate buffer; ▽: sodium phosphate buffer; ○: Tris-HCl. (B) The effects of temperature on total, hydrolysis and transfructosylation activities.

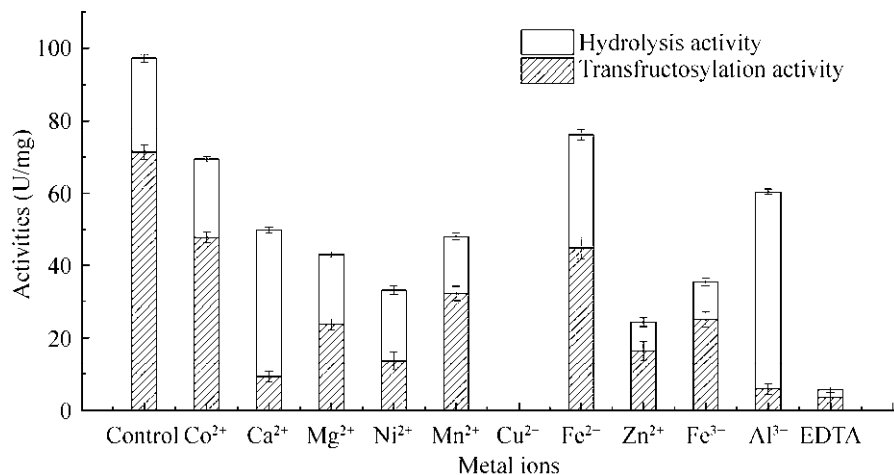


图 4 金属离子对 Laps-IS 酶活的影响

Fig. 4 The effect of metal ions on the activities of Laps-IS.

Cu^{2+} 即可使酶失活。金属离子对转糖基酶活的影响较水解酶活大,使得 T/H 都减小。因此,可以判定 Laps-IS 为金属离子抑制型酶。这一结果与目前已报道的不同。例如, Ca^{2+} 可以在不同程度上促进罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 121^[17]和 *L. gasseri*^[18]来源的 IS 的酶活, Mn^{2+} 可以将 *L. gasseri* DSM 20604 来源的 IS 酶活提高 57%^[21]。*B. agaradhaerens* WDG185 来源的 IS 酶活不受金属离子的影响,因为该酶没有金属离子结合位点^[22]。而通过序列比对可以发现 Laje-IS 与 Lajo-IS 一致,存在 Ca^{2+} 结合残基。导致金属离子不仅不促进 Laje-IS 酶活,反而抑制其酶活的原因,可能是金属离子结合位点附近的微环境的变化对底物结合口袋产生影响。其分子机制有待进一步研究。

2.4 产物结构鉴定

由于 IS 和 LS 在反应进程,酶分子结构及催化机理等方面存在很多相似性。甚至 *Lactobacillus* 来源的两种酶,在氨基酸序列上都表现出很高的

相似性。本课题组曾研究过 *L. reuteri* LTH5448 来源的 LS,它的氨基酸序列一致性与 IS 更接近,而产物却是 levan 型果聚糖^[23]。因此,仅从序列上无法判断酶的种类。通过产物果聚糖的糖苷键型,判断产物果聚糖的种类,进而确定酶的种类,是区分 IS 和 LS 最直接的方法。酶法合成的果聚糖分子内糖苷键单一,可通过 NMR 进行鉴定。

NMR 结果如图 5 所示。5A 为 NMR-¹³C 图谱,可以看到 6 个明显的单峰,无杂峰,分别代表果糖基上处于不同化学环境的 6 个碳原子。化学位移分别为 62.39 ppm (C-1)、104.56 ppm (C-2)、78.52 ppm (C-3)、75.83 ppm (C-4)、82.47 ppm (C-5) 和 62.39 ppm (C-6)。NMR-¹H 图谱如图 5B,氢原子的化学位移和裂分状态,与 levan 果聚糖的氢谱不同,与菊糖的氢谱一致。因此,将峰型和相对位置与目前已报道的微生物酶法合成果聚糖的结果进行比对(表 1),可以确定本研究 *L. psittaci* DSM 15354 来源重组酶为 IS。

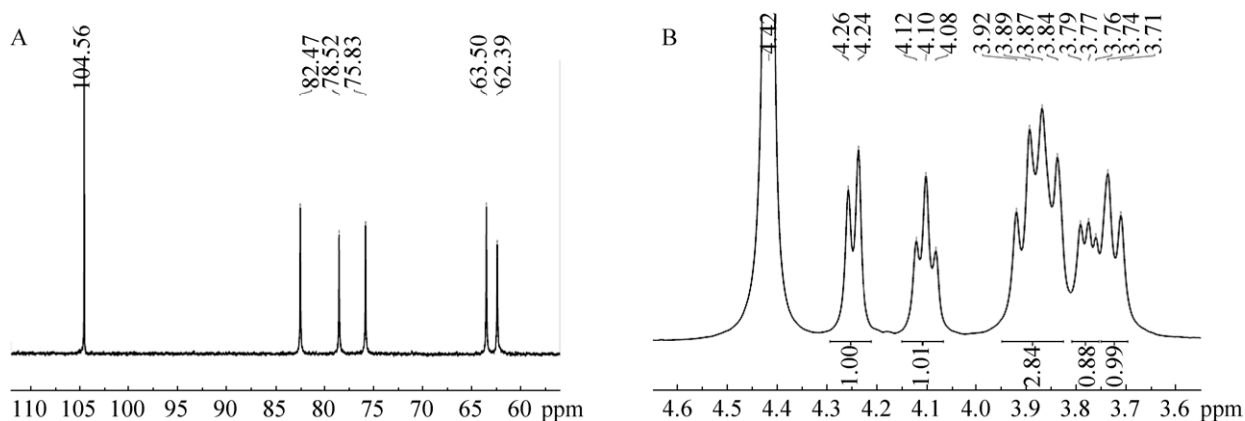


图 5 Laps-IS 产物多糖的 NMR 图谱 (A: NMR-¹³C 图谱; B: NMR-¹H 图谱)

Fig. 5 The NMR spectra of produced polysaccharide. (A) The spectrum of NMR-¹³C. (B) The spectrum of NMR-¹H.

表 1 已报到的酶法合成果聚糖产物的 ¹³C 原子化学位移

Table 1 ¹³C chemical shifts of reported fructans biosynthesized enzymatically

Microorganisms	Products	Carbon atom number					
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
<i>L. gasseri</i> DSM20604 ^[21]	Inulin	62.15	104.25	78.31	75.62	82.2	63.21
<i>L. johnsonii</i> NCC 533 ^[16]	Inulin	62.2	104.2	78.3	75.6	82.2	63.1
<i>L. citreum</i> CW28 ^[24]	Inulin	61.4	103.6	77.5	74.9	81.8	62.7
<i>L. psittaci</i> DSM 15354	Inulin	62.39	104.56	78.52	75.83	82.47	62.39
<i>B. goodwinii</i> ^[25]	Levan	60.95	104.57	77.27	75.91	80.67	63.83
<i>L. reuteri</i> LTH5448 ^[23]	Levan	60.93	104.55	77.25	75.90	80.66	63.81

2.5 蔗糖浓度的优化

研究表明 *L. reuteri* 121 来源的 IS 的总酶活和转糖基酶活的反应动力学参数, 不遵循米氏方程底物饱和的典型特征, 因为这两种酶活不能被蔗糖饱和^[26]。因此, 蔗糖浓度可能对菊糖的产量产生重要影响。如图 6 所示, 为酶活和菊糖产量随蔗糖浓度的变化。可以看出, 在蔗糖浓度从 100 g/L 增加到 700 g/L 时, 转糖基酶活不断增加, 使得总酶活也不断增加。这说明了 Laps-IS 总酶活和转糖基酶活的底物不饱和现象。相反, 水解酶活在不同的蔗糖浓度下, 变化不大, 说明水解酶活被底物饱和。高的蔗糖浓度有利于促进转糖基反应的发生, 这一现象在一些研究中也有报道^[27-29]。当蔗糖浓度从 700 g/L 增加到 800 g/L 时, 菊糖产量降低了 13.5%。这可能是由于生成的菊糖部分水解造成的。因此, 将蔗糖浓度定为 700 g/L, 进行加酶量的影响研究。

2.6 加酶量浓度的优化

加酶量是影响菊糖产量的另一个重要因素。在 700 g/L 的蔗糖中, 分别加入不同量的蔗糖, 结果如图 7 所示。随着加酶量的增加, 转糖基酶活和总酶活都总体呈现下降趋势, 这是由二者底物不饱和造成的。菊糖的产量随着加酶量的增加而提高, 当加酶量增加到 4 U/mL 时达到最大。

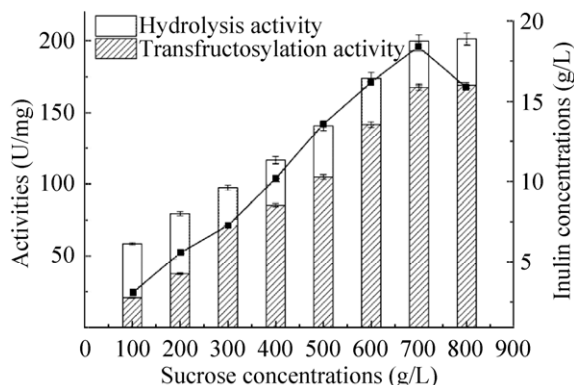


图 6 蔗糖浓度对 Laps-IS 酶活和菊糖产量的影响

Fig. 6 The effect of sucrose concentration on activities and inulin production.

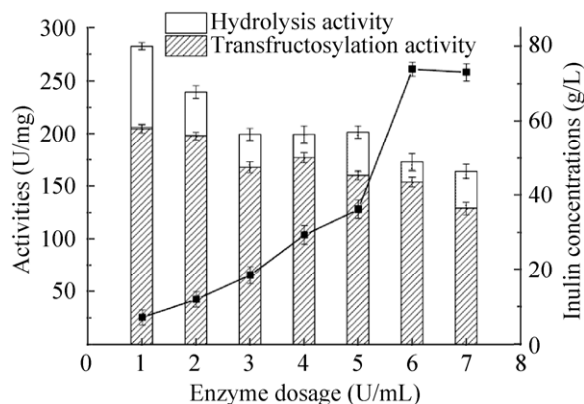


图 7 加酶量对 Laps-IS 酶活和菊糖产量的影响

Fig. 7 The effect of enzyme dosage on activities and inulin production.

之后再提高加酶量, 菊糖产量略微降低。同样的现象在 LS 中也被观察到。*Brenneria goodwinii* 来源的 LS, 当每克蔗糖加入 6 U 的酶时, levan 产量最大, 之后略有降低^[25]。因此, 在确定蔗糖浓度等的条件下, Laps-IS 产菊糖的最适加酶量为 4 U/mL。

2.7 菊糖生产的反应进程

以 700 g/L 的蔗糖为底物, 加酶量 4 U/mL, 在 pH 5.5 和 45 °C 条件下进行反应。反应体系中菊糖的浓度随时间的变化如图 8 所示。随着反应的进行, 蔗糖不断被转化为菊糖, 7 h 时产量达到最大, 约为 287 g/L, 蔗糖到菊糖的转化率为 41%。*B. goodwinii* 来源的 LS 在优化条件下, levan 型果聚糖的产量为 185 g/L^[25]。*L. gasserii* DSM 20604 来源的 IS 在优化条件下, 菊糖的产量为 53 g/L^[21]。本研所得到的重组酶 Laps-IS 是目前报道的菊糖产量和蔗糖到菊糖转化率最高的 IS。这可能与 Laps-IS 高的转糖基能力有关。通过利用 IS 的转糖基能力, 可以以蔗糖为供体、某些其他糖类为受体, 进行受体反应, 生产新型低聚糖^[30-31]。因此, Laps-IS 进行受体反应的转糖基能力, 值得进一步研究。

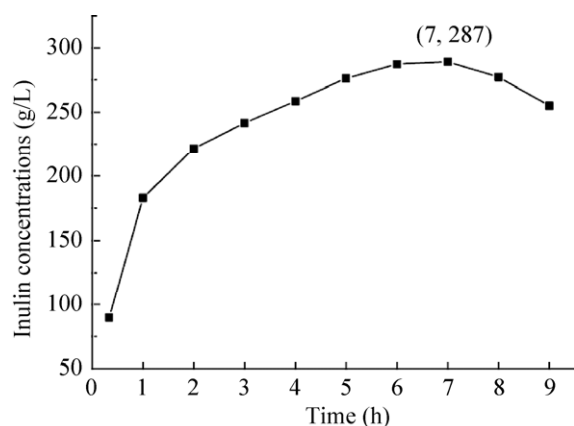


图 8 Laps-IS 菊糖产量的反应进程

Fig. 8 Reaction process of inulin production.

3 结论

本研究通过基因数据库筛选获得来源于 *L. psittaci* DSM 15354 的基因片段。通过截断的方式构建重组质粒。经重组表达、分离纯化，获得分子量为 65 kDa 的纯酶。通过对酶学性质进行鉴定，获得以蔗糖为唯一底物时的最适反应条件。产物鉴定表明产物多糖为菊糖，进而判定该重组酶为菊糖生产酶 IS。最后，对菊糖生产条件进行优化，使菊糖的最大产量为 287 g/L。目前国内对 IS 的研究较少，本研究鉴定的 IS 具有高的转糖基能力，蔗糖到菊糖的转化率高，有工业应用的前景。此外，本研究有利于促进对该类酶的认识，为 IS 和微生物菊糖的进一步研究提供基础。

REFERENCES

- [1] Moradali MF, Rehm BH. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18(4): 195-210.
- [2] Xu W, Ni DW, Zhang WL, et al. Recent advances in levansucrase and inulosucrase: evolution, characteristics, and application. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(22): 3630-3647.
- [3] Ahmed W, Rashid S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1): 1-13.
- [4] Öner ET, Hernández L, Combie J. Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnol Adv*, 2016, 34(5): 827-844.
- [5] Shoda SI, Uyama H, Kadokawa JI, et al. Enzymes as green catalysts for precision macromolecular synthesis. *Chem Rev*, 2016, 116(4): 2307-2413.
- [6] Shoaib M, Shehzad A, Omar M, et al. Inulin: properties, health benefits and food applications. *Carbohydr Polym*, 2016, 147: 444-454.
- [7] Karimi R, Azizi MH, Ghasemlou M, et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydr Polym*, 2015, 119: 85-100.
- [8] Meyer D, Bayarri S, Tárrega A, et al. Inulin as texture modifier in dairy products. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(8): 1881-1890.
- [9] Vogt L, Meyer D, Pullens G, et al. Immunological properties of inulin-type fructans. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2015, 55(3): 414-436.
- [10] Gupta N, Jangid AK, Pooja D, et al. Inulin: a novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 852-863.
- [11] Ni DW, Xu W, Zhu YY, et al. Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(2): 306-318.
- [12] Ni DW, Zhu YY, Xu W, et al. Production and physicochemical properties of food-grade high-molecular-weight *Lactobacillus* inulin. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(21): 5854-5862.
- [13] 倪大伟, 徐炜, 张文立, 等. 微生物菊糖蔗糖酶及在食品中的应用研究进展. *食品科学*, (2020-05-14). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200514.0938.014.html>.
- [14] Ni DW, Xu W, Zhang WL, et al. Research progress on microbial inulosucrase and its applications in food. *Food Sci*. (2020-05-14). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200514.0938.014.html> (in Chinese).
- [15] Anwar MA, Leemhuis H, Pijning T, et al. The role of conserved inulosucrase residues in the reaction and product specificity of *Lactobacillus reuteri* inulosucrase. *FEBS J*, 2012, 279(19): 3612-3621.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the

- quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [16] Anwar MA, Kralj S, Van Der Maarel MJEC, et al. The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(11): 3426-3433.
- [17] Van Hijum SAFT, Van Geel-Schutten GH, Rahaoui H, et al. Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4390-4398.
- [18] Anwar MA, Kralj S, Piqué AV, et al. Inulin and levan synthesis by probiotic *Lactobacillus gasseri* strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products. *Microbiology*, 2010, 156(4): 1264-1274.
- [19] Del Moral S, Olvera C, Rodríguez ME, et al. Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochem*, 2008, 9: 6.
- [20] Wada T, Ohguchi M, Iwai Y. A novel enzyme of *Bacillus* sp. 217C-11 that produces inulin from sucrose. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, 67(6): 1327-1334.
- [21] Ni DW, Zhu YY, Xu W, et al. Biosynthesis of inulin from sucrose using inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 1209-1218.
- [22] Kralj S, Leeflang C, Sierra EI, et al. Synthesis of fructooligosaccharides (FosA) and inulin (InuO) by GH68 fructosyltransferases from *Bacillus agaradhaerens* strain WDG185. *Carbohydr Polymers*, 2018, 179: 350-359.
- [23] Ni DW, Xu W, Bai YX, et al. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448. *Int J Biol Macromol*, 2018, 113: 29-37.
- [24] Olivares-Illana V, Wachter-Rodarte C, Le Borgne S, et al. Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, 28(2): 112-117.
- [25] Liu Q, Yu SH, Zhang T, et al. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*. *Carbohydr Polymers*, 2017, 157: 1732-1740.
- [26] Van Hijum SAFT, Van Der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Kinetic properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. *FEBS Lett*, 2003, 534(1/3): 207-210.
- [27] Peña-Cardeña A, Rodríguez-Alegría ME, Olvera C, et al. Synthesis of fructooligosaccharides by IsIA4, a truncated inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. *BMC Biotechnol*, 2015, 15: 2.
- [28] Ozimek LK, Kralj S, Kaper T, et al. Single amino acid residue changes in subsite -1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized. *FEBS J*, 2006, 273(17): 4104-4113.
- [29] González-Garcinuño Á, Tabernero A, Sánchez-Álvarez JM, et al. Effect of bacteria type and sucrose concentration on levan yield and its molecular weight. *Microb Cell Factor*, 2017, 16: 91.
- [30] Díez-Municio M, Herrero M, De Las Rivas B, et al. Synthesis and structural characterization of raffinosyl-oligofructosides upon transfructosylation by *Lactobacillus gasseri* DSM 20604 inulosucrase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6251-6263.
- [31] Díez-Municio M, De Las Rivas B, Jimeno ML, et al. Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(13): 4129-4140.

(本文责编 郝丽芳)