

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (4) :467 - 475; 4 April 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140399

## 阴沟肠杆菌 GX-3 的中性蔗糖酶在大肠杆菌中的表达及其特性鉴定

赵英丽, 吴倩倩, 张志凯, 王子龙, 韦宇拓, 黄日波, 杜丽琴\*

广西大学生命科学与技术学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005

**摘要:**【目的】在阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) GX-3 中发现了一个编码中性 pH 范围内起作用的蔗糖酶基因, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行克隆表达及纯化, 并研究该蔗糖酶的酶学性质, 为蔗糖酶的应用研究及开发利用奠定基础。【方法】通过查找 GenBank 数据库中来自阴沟肠杆菌同属中的编码蔗糖酶的基因序列, 对这些序列进行比对分析设计简并引物扩增保守区; 利用 PCR 扩增目的基因, 以 pQE30 为表达载体构建重组质粒; 镍亲和和层析纯化重组蛋白, 对重组酶的酶学性质进行详细研究。【结果】一个编码蔗糖酶的基因 (*Einv*) 被从阴沟肠杆菌 GX-3 中发现和克隆。生物化学特性鉴定表明这个蔗糖酶的活性最适温度为 40℃ 和最适 pH 为 6.5。凝胶渗透色谱法分析显示 *Einv* 是以二聚体的形式存在。*Einv* 这个蔗糖酶在 1170 mmol/L 的蔗糖条件下仍保留有 80% 以上的水解活性。而在高浓度的蔗糖条件下, *Einv* 只有水解活性而没有转糖基的副反应发生。它能够水解棉子糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖和水苏糖。【结论】获得的 *Einv* 是一个在中性 pH 范围内起作用的  $\beta$ -呋喃果糖苷酶, 只有水解功能而没有转糖基功能。这些特性表明这个中性蔗糖酶在食品工业具有重要的应用价值。

**关键词:** 阴沟肠杆菌 GX-3,  $\beta$ -呋喃果糖苷酶, 蔗糖酶, 中性 pH, 生物化学性质

**中图分类号:** Q814      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 04-0467-09

$\beta$ -呋喃果糖苷酶 (EC3.2.1.26) 是一类能够水解具有果糖基末端底物的酶。大多数的这种酶可以将蔗糖水解为葡萄糖和果糖; 它也具有果糖基转移酶活力, 可用于合成短链的低聚果糖<sup>[1]</sup>。根据所水解的底物,  $\beta$ -呋喃果糖苷酶具有不同的名字, 能水解蔗糖的命名为蔗糖酶, 能水解菊粉的为菊粉酶和  $\beta$ -果糖苷酶<sup>[2]</sup>。

蔗糖酶催化蔗糖的水解产生 D-果糖和 D-葡萄糖的混合产物, 是植物新陈代谢的碳源和能源供

应的主要形式<sup>[3]</sup>。在工业中蔗糖的水解上蔗糖酶是很重要的, 是提供食品和发酵工艺上所需的长效碳源。在食品工业上, 蔗糖酶处理的糕点可以保证在长时间储藏后中间的馅仍保持新鲜和柔软。蔗糖被蔗糖酶水解后的产物包含等摩尔的果糖和葡萄糖, 也称转化糖 (invert sugar), 相比于蔗糖具有低的结晶特性, 同时由于转化糖中果糖的存在而甜度更高<sup>[4]</sup>, 并且具有用淀粉制备的高果糖糖浆相似的特性, 因此可用来作为高果糖糖浆

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060125)

\* 通信作者。Tel: +86-771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

作者简介: 赵英丽 (1988 -), 女, 河南孟州人, 硕士研究生, 主要从事分子酶工程及蛋白质改造研究。E-mail: yingliase@163.com

收稿日期: 2014-08-13; 修回日期: 2014-11-20

的替代物。因而蔗糖酶在食品工业上具有很多重要的应用。在酒精工业中,酵母中的蔗糖酶可以在糖蜜中存在抑制剂的条件下水解蔗糖,使得酵母能够发酵甘蔗糖蜜生成酒精<sup>[5]</sup>。蔗糖酶的其他应用包括化妆品、药品和造纸工业中的增塑剂以及在生物电子应用中做为酶电极<sup>[6-7]</sup>。最近,酶电极生物传感器已经成为研究的目标,新的方法使得这项技术被更广泛的应用<sup>[6-8]</sup>。在酶生物传感器中是以蔗糖酶水解蔗糖的活力作为一个信号,这类生物传感器要求蔗糖酶在中性 pH 条件下进行催化反应,同时要求蔗糖酶只有水解活性而没有其它副反应像如转糖基活力<sup>[9]</sup>。

但是,目前为止蔗糖酶的研究仍然局限在真菌和植物来源的蔗糖酶上面<sup>[10]</sup>。蔗糖酶目前被分为两类:按活性作用的 pH 值范围来分有酸性蔗糖酶和中性/碱性蔗糖酶两个类群<sup>[11]</sup>。酸性蔗糖酶是目前研究最多的一类,特别是来自酿酒酵母的蔗糖酶<sup>[4]</sup>。这个蔗糖酶也是目前工业中使用的蔗糖酶。而对于中性蔗糖酶它们主要是存在植物中,在中性 pH 条件下具有酶活力并且主要是以蔗糖为唯一的底物<sup>[11-16]</sup>。虽然一些课题组在大肠杆菌中克隆和表达了中性蔗糖酶<sup>[14]</sup>,但是由于它们的活性不稳定和难纯化而难于被研究,目前被彻底研究并提供工业应用的并不多<sup>[17]</sup>。但在食品工业,从甘蔗汁转化水解蔗糖往往都是在中性条件下进行<sup>[18]</sup>。因而许多科研小组寻找在中性条件下作用的蔗糖酶,有通过固定化酶的方法使得酸性蔗糖酶的最适 pH 值提高的同时阻止寡糖的形成和提供其稳定性<sup>[19-21]</sup>,也有使用宏基因组技术从土壤环境中获得了新的中性蔗糖酶<sup>[22]</sup>或者通过将酸性蔗糖酶 N 端序列截短后使其最适 pH 向中性偏移<sup>[23]</sup>。

本研究从自行筛选到的阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 菌株 GX-3<sup>[24]</sup> 中克隆到了一个中性 pH 范围内起作用的蔗糖酶,并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中成功表达。该蔗糖酶在 1170 mmol/L 的高蔗糖浓度条件下仍保留有 80% 以上的水解活性,但是没有转糖基的副反应发生。它能够水解棉子糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖和水苏糖。这些特性表明这个中性蔗糖酶在食品工业具有重要的应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-blue 和 M15/pREP4、阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) GX-3、载体 pQE30 为本实验室保存。分子生物学工具酶包括限制性内切酶、DNA 连接酶以及 PCR 扩增聚合酶购自大连 TaKaRa 公司。蛋白质镍亲和层析 (Ni-NTA) 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。标准蛋白质样品 Ferritin horse (Mr 450000)、Catalase bovine (Mr 240000)、Albumin bovine (BSA) (Mr 67000)、Albumin egg (Mr 45000) 和 Myoglobin equine (Mr 17800), 均购自德国 SERVA 公司。蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖购自 WaKo, 水苏糖和棉子糖购自 Sigma。其他试剂均为国产分析纯试剂。

### 1.2 蔗糖酶基因 *Einv* 保守区的获得

从 GenBank 中查找阴沟肠杆菌属 *Enterobacter* 同属中的编码蔗糖酶基因, 比对分析查找保守区后设计简并引物: 上游引物 I-1: 5'-AGGCTATANC GGCCACGTGCGCGA-3'; 下游引物 I-2: 5'-CGCAG CGGCCAGNAGCAGAATGC-3'。以阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) GX-3 总 DNA 为模板, 用引物 I-1、I-2 扩增保守区。PCR 反应程序: 94°C 3 min; 94°C 30s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物连接到载体 pMD19-T, 转化到大肠杆菌中。通过蓝白筛选挑取白色阳性菌落, 送去华大公司测序。

### 1.3 蔗糖酶基因 *Einv* 的克隆

保守区序列使用 Vector NTI Advance 10 软件进行序列拼接, 使用 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BlastN 和 BlastX 工具进行序列比对和分析。

与保守区序列同源性最高的基因用简单组件结构研究工具 (Simple Modular Architecture Research Tool, SMART, <http://smart.embl-heidelberg.de>) 分析其编码的氨基酸序列的组件结构。然后设计目的基因 *Einv* 的扩增引物: Einv-1: 5'-ATGAGATCT ACGTTATCTTCCCGCTGGCCTGCCG-3'; Einv-2: 5'-CTCAAGCTTCTATTCTACCATGCAGCCGCGCAGC-3'。在上游引物 Einv-1 中引入 *Bgl* II 酶切位点, 在下游引物 Einv-2 中引入 *Hind* III 酶切位点。PCR 反应程序: 95°C 2 min; 98°C 10 s, 57.5°C 15 s, 72°C

2 min, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增的目的片段经 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切后, 与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的表达载体 pQE30 连接, 用  $\text{CaCl}_2$  法转入大肠杆菌菌株 XL1-blue 中。构建的重组质粒命名为 pQE-Einv。

#### 1.4 重组蛋白质 Einv 的表达与纯化

重组质粒 pQE-Einv 转入到大肠杆菌 (*E. coli*) M15/pREP4 中, 37°C 培养至  $OD_{600}$  0.6, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 37°C 诱导 8 h。表达的重组蛋白 Einv 按照 Qiagen 公司蛋白质纯化试剂盒使用说明用镍亲和层析 Ni-NTA 进行纯化, 再通过 30 kDa 的超滤膜脱盐处理。

纯化的 Einv 蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 (SDS-PAGE) 和凝胶过滤色谱分析 (GPC)。GPC 条件: 色谱柱: PROTEIN KW-803 (Shodex, 8 × 300 mm, Kanagawa, Japan); 检测器: Model 2998 photodiode array detector (Waters Corporation, Milford, MA, USA); 检测波长: 280 nm; 流动相: pH 6.5 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 - 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (加入 100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25°C。

#### 1.5 重组蛋白 Einv 的酶活力测定及酶学性质的研究

蔗糖酶活力测定使用 DNS 定糖法<sup>[25]</sup>: 取 0.007  $\mu\text{g}$  纯化的蛋白 Einv 至 0.2 mL 终浓度为 1% 蔗糖中, 反应体系在最适的酶反应条件下作用 20 min 后, 加入 2 倍体积 DNS 试剂终止反应, 沸水煮 5 min, 迅速冷却, 在 540 nm 处测 OD 值。

一个蔗糖酶的酶活力单位 (U) 定义为在最适的酶反应条件下每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的酶。

蛋白质含量的测定参照 Bradford<sup>[26]</sup> 的方法, 以牛血清白蛋白为标准品。

所有的实验都做 3 个平行实验。

**1.5.1 最适 pH 和 pH 稳定性的测定:** (1) 取 0.007  $\mu\text{g}$  纯化的蛋白 Einv 至 0.2 mL 终浓度为 1% 蔗糖中, 反应体系在 37°C 条件下, 在 pH 4.0 - 8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中测定酶反应的 pH 效应。(2) 酶的 pH 稳定性的测定是将酶放置于不同 pH (4.0 - 8.0) 条件下, 4°C 保存 24 h, 然后测定酶活力。

**1.5.2 最适温度和热稳定性的测定:** (1) 取 0.007  $\mu\text{g}$  纯化的蛋白 Einv 至 0.2 mL 终浓度为 1% 蔗糖

中, 反应体系在最适 pH 条件下, 温度在 25°C - 65°C 之间测定酶反应的温度效应。(2) 酶的热稳定性的测定是将酶分别放置于 4°C、25°C、30°C, 不同的时间间隔取出一定蛋白进行酶活的测定。

**1.5.3  $K_m$  和  $V_{max}$  的测定:** 将蔗糖溶于 pH 为 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中配制成一系列不同浓度的蔗糖溶液 (15 - 585 mmol/L), 分别加入  $1.3 \times 10^{-7}$  微摩尔纯化的蛋白质, 40°C 反应 20 min, 用典型的米氏方程求出 Einv 的  $K_m$  和  $V_{max}$  值。

**1.5.4 底物抑制和转糖苷活性:** (1) 底物抑制的测定是将不同浓度的蔗糖溶液 (15 - 1170 mmol/L) 和 0.007  $\mu\text{g}$  纯化的蛋白质在最适 pH 和最适温度条件下反应 20 min, 测定在不同底物浓度下 Einv 的酶活力。(2) 转糖苷活性的研究是将 32  $\mu\text{g}$  纯化的重组酶与不同浓度的蔗糖 (50 - 1000 mmol/L) 在 35°C 条件下反应 12 h, 然后煮沸 10 min 终止反应, 进行高效液相色谱 (HPLC) 分析检测其各种反应产物。

**1.5.5 金属离子对酶活的影响:** 纯化的重组酶与终浓度为 5 mmol/L 的金属离子  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  在酶反应的最适条件下反应 20 min, 测定它们对酶活力的影响, 以不添加金属离子的酶的活力为 100%。

**1.5.6 底物特异性:** 在反应总体积为 200  $\mu\text{L}$ 、pH 6.5 的缓冲液溶液中, 分别以终浓度为 100 mmol/L 的松三糖 (三糖,  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3- $\beta$ ,  $\alpha$ 2-1 糖苷键)、棉子糖 (三糖,  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6- $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2 糖苷键)、蔗果三糖 (三糖,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2- $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1 糖苷键)、蔗果四糖 (四糖,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2- $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1 糖苷键)、蔗果五糖 (五糖,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2- $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1 糖苷键)、水苏糖 (四糖,  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6- $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2 糖苷键) 和 1% 菊粉 (多糖,  $\alpha$ ,  $\beta$ 1-2- $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1 糖苷键) 为底物, 分别加入 32  $\mu\text{g}$  纯化的蛋白质, 40°C 作用 12 h。然后将反应物放置沸水中煮沸 10 min 终止反应, 室温冷却, 进行 HPLC 分析, 检测其反应产物。

HPLC 工作条件: (1) 仪器: 安捷伦 1100 色谱仪; (2) 检测器: Alltech 200ES 型蒸发光散色检测器; (3) 色谱柱: Alltima Amino 氨基柱 (250mm × 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ); (4) 流动相: 乙腈: 水 (75:25); (5) 流速: 1 mL/min; 柱温: 25°C。

#### 1.6 基因的核苷酸序列号

来自阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) GX-3 基因 Einv 的核苷酸序列上传到 GenBank 数据库中, 基因的序

列号为 KM 278529。

## 2 结果和讨论

### 2.1 蔗糖酶基因 *Einv* 的保守区分析及 *Einv* 的克隆

以阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) GX-3 总 DNA 为模板扩增基因 *Einv* 的保守区, 扩增产物约为 900bp。将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上后进行测序分析, 测序结果和 GenBank 公布的 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的假定蛋白 (hypothetical protein) ECL\_01932 同源性最高, 为 97%。

使用 SMART 软件分析 ECL\_01932 的氨基酸序列, 发现它只含有一个糖基水解酶 32 家族的结构

域。然后以 *E. cloacae* 菌株 GX-3 总 DNA 为模板, 使用 *Einv*-1 和 *Einv*-2 引物特异的扩增出一条大约为 1.4kb 的 DNA 条带。

### 2.2 重组蛋白 *Einv* 的表达及纯化

重组质粒 pQE-*Einv* 转入大肠杆菌中诱导表达后镍亲和和层析纯化。纯化的重组蛋白 *Einv* 分别进行 SDS-PAGE 和 GPC 分析, 结果见图 1。重组蛋白在 54 kDa 处有明显的蛋白质条带 (图 1-A), 与基因序列推测所得理论分子量一致。纯化的蛋白进行 GPC 分析, *Einv* 的保留时间为 11.494 min, 根据标准蛋白质样品制定的标准曲线计算得出 *Einv* 分子量大小为 104 kDa (图 1-B), 由此推测出 *Einv* 在天然活性状态下是以二聚体的形式存在的。

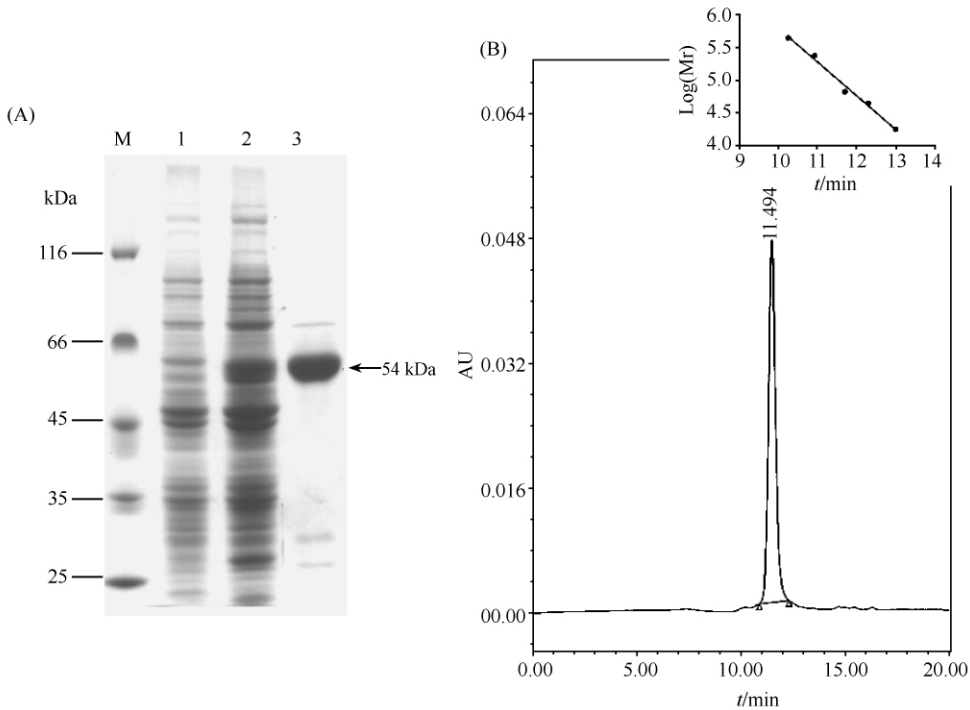


图 1. 重组蛋白 *Einv* 的 SDS-PAGE 和 GPC 分析

Figure 1. SDS-PAGE and GPC analysis of recombinant protein *Einv*. (A): SDS-PAGE of invertase *Einv* M: protein marker; lane 1: proteins of *E. coli* M15/ pQE30 with induction; lane 2: proteins of *E. coli* M15/ pQE-*Einv* with induction; lane 3: purified *Einv* protein. (B): GPC analysis of purified recombinant protein *Einv*.

### 2.3 重组蛋白 *Einv* 的酶学性质分析

**2.3.1 pH 对重组酶的影响:** *Einv* 在 pH 5.0 - 8.0 之间具有活性, 超出这个区间则活性完全丧失, 而最适 pH 值为 6.5; 并且 *Einv* 保存在 pH 5 - 8 之间的缓冲液中的酶活力比较稳定, 能保持 80% 以上的酶活力 (图 2-A)。

*Einv* 具有 6.5 的最适 pH 值, 这个特殊的性质

使它明显区别于其他已经报道的蔗糖酶。目前报道和应用的绝大多数蔗糖酶它们一般在 pH 3.5 - 6.0 具有活性, 最适 pH 值接近 4.5, 它们在 pH 大于 6.0 的情况下迅速失活<sup>[4, 27]</sup>。因而 *Einv* 为中性蔗糖酶, *Einv* 在 pH 大于 7.0 的条件下仍能保存 80% 的活性。应用广泛的酿酒酵母的蔗糖酶在最适 pH 5.0 保存 300 min 后失去了 35% 的酶活, 在 pH 6.0 保存

300 min 则失去了约 70% 酶活<sup>[21]</sup>, 在 pH 值大于 7.0 时保存 4 h 就不稳定了<sup>[28]</sup>。而来自宏基因的中性蔗糖酶 uninv 在 pH 大于 7.0 的条件下则只保留了 40% 的活性<sup>[22]</sup>。最适 pH 为中性和强的 pH 稳定性的蔗糖酶具有一定的工业应用价值, 比如可以用于转化糖的生产和生物传感器的酶电极中<sup>[6, 29]</sup>。

**2.3.2 温度对重组酶的影响:** 在 25 - 60°C 的温度间测定 Einv 的酶活, 最适温度为 40°C (图 2-B)。

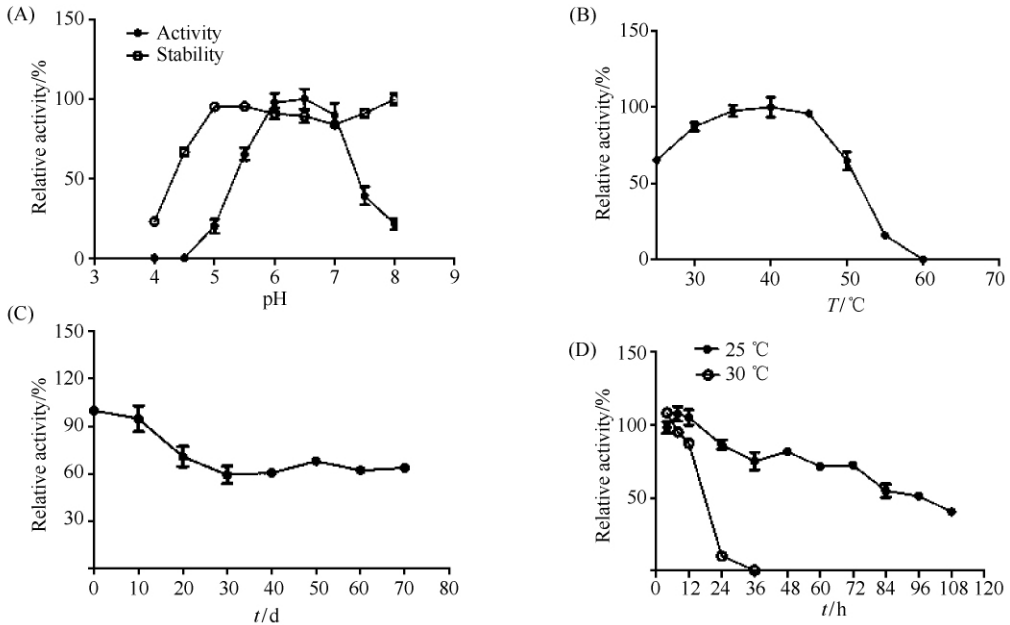


图 2. pH 和温度对重组蛋白 Einv 活性的影响

Figure 2. Effect of pH and temperature on recombinant enzyme activity. (A) : effect of pH on Einv; (B) : effect of temperature on Einv; (C) : thermal stability of Einv at 4°C; (D) : thermal stability of Einv at 25°C and 30°C.

**2.3.3 重组酶的  $K_m$  和  $V_{max}$  测定:** 将 Einv 与一系列的不同浓度蔗糖进行反应, 反应结果具有典型的米氏动力学特性 (图 3-A)。Einv 的  $K_m$  为  $79.85 \pm 6.664$  mmol/L,  $V_{max}$  值为  $2199 \pm 57.12$   $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $K_{cat}$  为  $1979.1$   $\text{s}^{-1}$ 。在已报道的不同来源的各种蔗糖酶中, 来自酿酒酵母的酸性蔗糖酶具有最高的转化数 ( $9400$   $\text{s}^{-1}$ )<sup>[30]</sup>, Einv 的转化数低于海栖热胞菌的酸性蔗糖酶 ( $2600$   $\text{s}^{-1}$ )<sup>[31]</sup>, 高于来自宏基因组文库的酸性蔗糖酶 Uninv2 ( $1447.6$   $\text{s}^{-1}$ )<sup>[23]</sup>。虽然, 有相关文献报道了一些中性的蔗糖酶, 但都没有酶稳定性的相关实验数据, 并且从植物 (比如甜菜和豌豆苗) 中获得的中性蔗糖酶通常对蔗糖具有非常低的  $K_m$  值, 但它们的水解速率也是很低的。

**2.3.4 重组酶的底物抑制及转糖苷活性的测定:** 将 Einv 和一系列不同蔗糖浓度溶液 (15 - 1170

对 Einv 的贮存稳定性进行了分析。当贮存在 4°C 时, 70 d 仍有 60% 的活力 (图 2-C)。Einv 的 4°C 贮存稳定性跟来自宏基因组文库的蔗糖酶截短体 M-inv2 是相似, 比来自相同文库的中性蔗糖酶 uninv 的要好<sup>[23]</sup>。当贮存在 25°C 和 30°C 时, 25°C 时酶活力随着时间的增加逐渐下降, 但放置 96 h 后仍有 50% 的活力, 而 30°C 在 12 h 后酶活力迅速下降, 36 h 失去了酶活 (图 2-D)。

mmol/L) 在 pH 6.5 和温度 40°C 作用 12 h。结果发现在蔗糖浓度为 290 mmol/L 时, Einv 的水解活性最高。此后, 水解活性随着蔗糖浓度的增大而稍微受到抑制, 在高底物浓度条件下 (585 - 1170 mmol/L) Einv 仍保持有 80% 以上的水解活性 (图 3-B)。

将 Einv 和一系列不同蔗糖浓度溶液 (50 - 1000 mmol/L) 在 35°C 作用 12 h 后的各反应产物 100°C 煮沸 10 min, 离心取上清进行 HPLC 分析。在整个蔗糖浓度范围内, HPLC 的分析表明都只有葡萄糖和果糖产生而没有其它产物产生, 即使在 1000 mmol/L 浓度的蔗糖存在下也没有其它产物产生, 由此推测 Einv 没有转糖基活性 (图 4)。

**2.3.5 金属离子对重组酶活力的影响:** Einv 对金属离子比较敏感 (图 5)。Ag<sup>+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 强烈抑制酶的活力, 使得酶活力几乎为零, Co<sup>2+</sup> 对酶

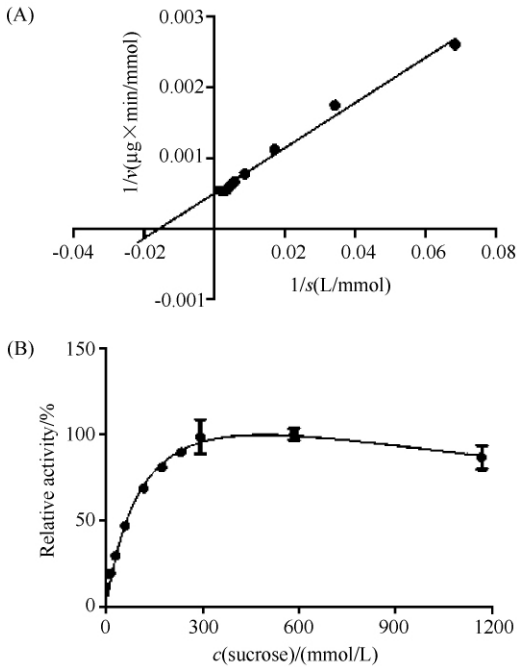


图 3. 不同底物浓度对重组酶活力的影响

Figure 3. Effect of different sucrose concentrations on enzyme activity. (A): analysis of Michaelis constants of Einv; (B): effect of sucrose concentration on enzyme activity.

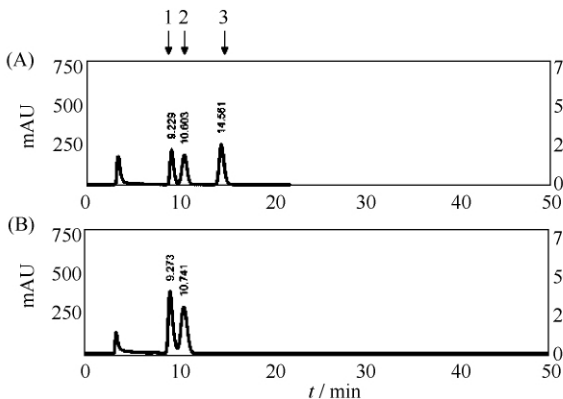


图 4. 重组酶的转糖苷反应产物 HPLC 分析

Figure 4. HPLC analysis of transglycosylation product of Einv. (A): sugar standard (1. fructose, 2. glucose, 3. sucrose); (B): transglycosylation product of Einv at 1000mmol/L sucrose concentration.

有明显的抑制作用,  $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Zn}^{2+}$  几乎不影响酶的活力,  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  对酶有轻微的激活作用,  $\text{Mn}^{2+}$  对酶有强烈的激活作用, 使其酶活高达 253%。金属离子  $\text{Mn}^{2+}$  对 Einv 的强烈的激活作用, 在酿酒酵母的蔗糖酶中也有相似的明显激活作用<sup>[32]</sup>。 $\text{Zn}^{2+}$  对 Einv 的活力影响不大, 而有文献报道 1mmol/L  $\text{Zn}^{2+}$  则完全抑制蔗糖酶的活力<sup>[15]</sup>。

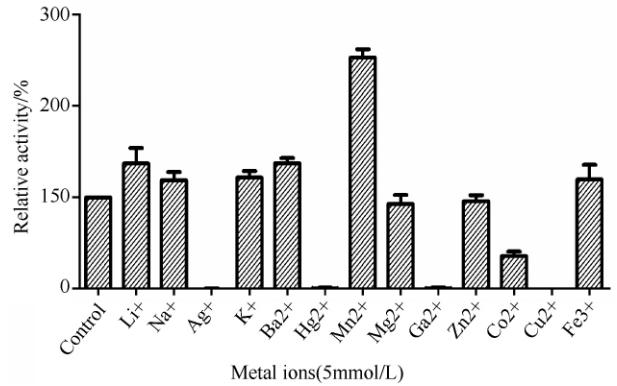


图 5. 金属离子对重组酶活力的影响

Figure 5. Effect of metal ions on recombinant enzyme activity.

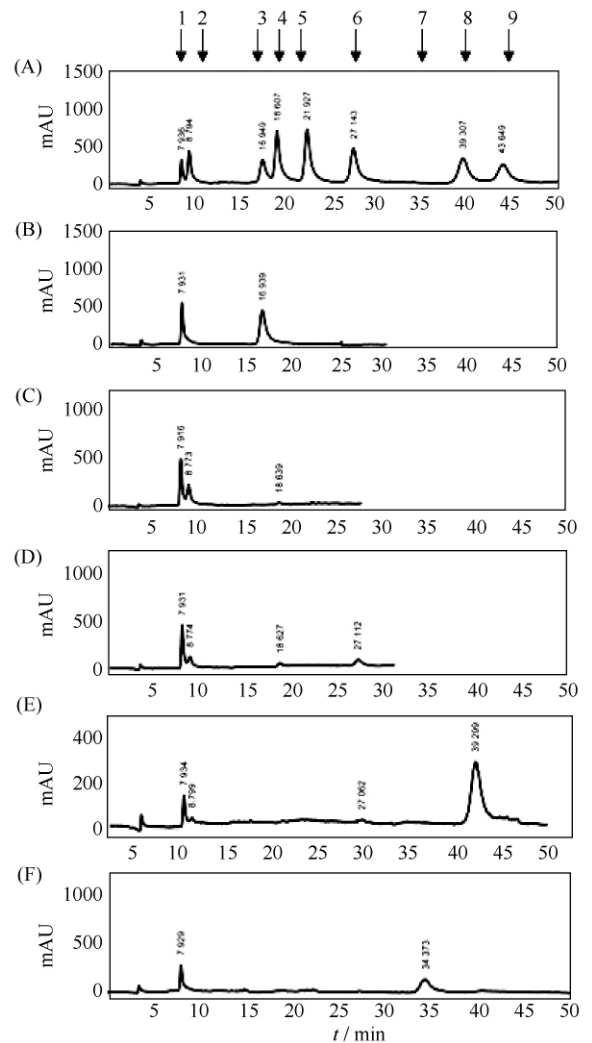


图 6. Einv 的底物特异性的 HPLC 分析

Figure 6. HPLC analysis of the products from substrate specificity tests. (A): sugar standard. Substrates: raffinose (B), 1-kestose (C), nystose (D), fructofuranosylnystose (E), stachyose (F). Peak numbers show the retention times for fructose (1), glucose (2), melibiose (3), 1-kestose (4), raffinose (5), nystose (6), trisaccharide unnamed (7), fructofuranosylnystose (8), stachyose (9).

### 2.3.6 重组酶的底物特异性及其产物 HPLC 分析

底物特异性分析表明 Einv 能水解棉子糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖和水苏糖, 但是不能水解松三糖和菊糖 (图 6)。在这些反应中, Einv 将棉子糖水解为果糖和蜜二糖, 将蔗果三糖水解为果糖和葡萄糖, 将蔗果四糖水解为果糖、葡萄糖和蔗果三糖, 将蔗果五糖水解为果糖、葡萄糖和蔗果四糖, 将水苏糖水解为果糖和一个三糖。

水解低分子量低聚果糖是糖基水解酶 32 家族蔗糖酶的特性<sup>[33]</sup>。由于 Einv 可以从连有果糖的聚糖中分解出果糖, 例如蔗糖四糖, 因此可以确定 Einv 是一个外切糖苷酶。Einv 不能水解菊糖, 这个特性在来自其他微生物的蔗糖酶上也发现了<sup>[4,23]</sup>。

## 3 结论

本文从实验室自行筛选到的阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) GX-3 菌株中通过查找同属菌株中编码蔗糖酶的基因序列进行比对分析, 获得一个编码中/碱性蔗糖酶的基因。该蛋白质与 *E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047 的假定蛋白 ECL\_01932 同源性最高, 为 98%。该蔗糖酶基因在大肠杆菌中进行了重组表达和纯化, 对重组蔗糖酶的酶学性质进行了详细的研究。Einv 的最适 pH 和温度分别是 pH 6.5 和 40°C,  $K_m$  和  $V_{max}$  为  $79.85 \pm 6.664$  mmol/L 和  $2199 \pm 57.12$   $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 天然蛋白是以二聚体的形式存在; 金属离子  $\text{Mn}^{2+}$  对其有明显的激活作用,  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  则对 Einv 有强烈的抑制作用; 该酶能够水解棉子糖、蔗果三糖、蔗果四糖、蔗果五糖和水苏糖; Einv 没有转糖基功能。本研究首次在阴沟肠杆菌中发现了一个在中性 pH 范围内作用的蔗糖酶, 并且具有的特性表明这个中性蔗糖酶在食品工业将具有重要的应用价值。

## 参考文献

[1] Alvaro-Benito M, de Abreu M, Fernandez-Arrojo L, Plou FJ, Jimenez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernandez-Lobato M. Characterization of a beta-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *Journal of Biotechnology*, 2007, 132 (1): 75-

81.

- [2] Warchol M, Perrin S, Grill J-P, Schneider F. Characterization of a purified  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC15697. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 35 (6): 462-467.
- [3] Kim D, Lee G, Chang M, Park J, Chung Y, Lee S, Lee TK. Purification and biochemical characterization of insoluble acid invertase (INAC-INV) from pea seedlings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59 (20): 11228-11233.
- [4] Goosen C, Yuan XL, van Munster JM, Ram AF, van der Maarel MJ, Dijkhuizen L. Molecular and biochemical characterization of a novel intracellular invertase from *Aspergillus niger* with transfructosylating activity. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6 (4): 674-681.
- [5] Takeshige K, Ouchi K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79 (5): 513-515.
- [6] Bagal-Kestwal D, Karve MS, Kakade B, Pillai VK. Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24 (4): 657-664.
- [7] Kotwal SM, Shankar V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, 2009, 27 (4): 311-322.
- [8] Xiang Y, Lu Y. Using personal glucose meters and functional DNA sensors to quantify a variety of analytical targets. *Nature Chemistry*, 2011, 3 (9): 697-703.
- [9] Amine A, Mohammadi H, Bourais I, Palleschi G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21 (8): 1405-1423.
- [10] Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377 (2): 378-385.
- [11] Bocock PN, Morse AM, Dervinis C, Davis JM. Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa*. *Planta*, 2008, 227 (3): 565-576.
- [12] Lee H-s, Sturm A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiology*, 1996, 112 (4): 1513-1522.
- [13] Martin ML, Lechner L, Zabaleta EJ, Salerno GL. A

- mitochondrial alkaline/neutral invertase isoform (A/N-InvC) functions in developmental energy-demanding processes in *Arabidopsis*. *Planta*, 2013, 237 (3) : 813-822.
- [14] Sturm A, Hess D, Lee HS, Lienhard S. Neutral invertase is a novel type of sucrose-cleaving enzyme. *Physiologia Plantarum*, 1999, 107 (2) : 159-165.
- [15] Vargas WA, Salerno GL. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: Alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. *Plant Science*, 2010, 178 (1) : 1-8.
- [16] Vorster DJ, Botha FC. Partial purification and characterisation of sugarcane neutral invertase. *Phytochemistry*, 1998, 49 (3) : 651-655.
- [17] Roitsch T, Gonzalez MC. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*, 2004, 9 (12) : 606-613.
- [18] Rito-Palomares MA, Serna-Saldivar SR. Production of invert syrup from sugarcane juice using immobilized invertase. US: patent 7435564. 2008.
- [19] Danisman T, Tan S, Kacar Y, Ergene A. Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membrane. *Food Chemistry*, 2004, 85 (3) : 461-466.
- [20] Milovanović A, Božić N, Vujčić Z. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food Chemistry*, 2007, 104 (1) : 81-86.
- [21] Sanjay G, Sugunan S. Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chemistry*, 2006, 94 (4) : 573-579.
- [22] Du LQ, Pang H, Hu YY, Wei YT, Huang RB. Expression and characterization in *E. coli* of a neutral invertase from a metagenomic library. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 26 (3) : 419-428.
- [23] Du L, Pang H, Wang Z, Lu J, Wei Y, Huang R. Characterization of an invertase with pH tolerance and truncation of its N-terminal to shift optimum activity toward neutral pH. *PloS One*, 2013, 8 (4) : e62306.
- [24] 黄金群. 来自阴沟肠杆菌 GX-3 的编码 GH3 的基因功能鉴定及分子改造. 广西大学硕士学位论文, 2014.
- [25] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 1959, 31 (3) : 426-428.
- [26] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [27] de Los Angeles Calixto-Romo M, Santiago-Hernandez JA, Vallejo-Becerra V, Amaya-Delgado L, del Carmen Montes-Horcasitas M, Hidalgo-Lara ME. Expression, purification and immobilization of the intracellular invertase INVA, from *Zymomonas mobilis* on crystalline cellulose and Nylon-6. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35 (11) : 1455-1463.
- [28] Schülke N, Schmid FX. The stability of yeast invertase is not significantly influenced by glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263 (18) : 8827-8831.
- [29] Chaplin MF, Bucke C. Enzyme Technology. London: Cambridge University Press, 1990.
- [30] Reddy A, Maley F. Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271 (24) : 13953-13957.
- [31] Liebl W, Brem D, Gotschlich A. Analysis of the gene for beta-fructosidase (invertase, inulinase) of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*, and characterisation of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50 (1) : 55-64.
- [32] Karkas T, Önal S. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 60: 142-150.
- [33] Ettalibi M, Baratti JC. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 26 (1) : 13-20.



# Expression and characterization of a neutral *Enterobacter cloacae* GX-3 invertase

Yingli Zhao, Qianqian Wu, Zhikai Zhang, Zilong Wang, Yutuo Wei, Ribo Huang, Liqin Du\*

College of Life Science and Technology, Guangxi University; State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources. Nanning 530005, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

**Abstract:** [Objective] To characterize a neutral invertase from *Enterobacter cloacae* GX-3. [Methods] By searching GenBank database, we found the genes encoding invertase from the same genus *Enterobacter*. These sequences were aligned and analyzed. Then, a gene encoding neutral invertase was amplified by PCR. The recombinant plasmid pQE-Einv was constructed. We purified the expressed protein Einv with nickel-nitrilotriacetic acid chromatography. At last, the characteristics of the recombinant protein Einv were studied in detail. [Results] A gene encoding neutral invertase was discovered and cloned from *E. cloacae* GX-3. The recombinant enzyme Einv was characterized. Einv had an optimum pH of 6.5 and an optimum temperature of 40°C. The results of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and gel permeation chromatography (GPC) showed that Einv was a homo-dimer protein. Einv retained 80% activity at sucrose concentrations up to 1170 mmol/L. But, Einv had no transglycosylation activity at high sucrose concentration. It could hydrolyze raffinose, 1-kestose, nystose, fructofuranosylnystose and stachyose. [Conclusion] It is first reported that an invertase from *Enterobacter cloacae* is a  $\beta$ -fructofuranosidase at neutral pH range. It only has hydrolysis activity without transglycosylation activity. These characteristics indicate that the neutral invertase Einv has important applications in food industry.

**Keywords:** *Enterobacter cloacae* GX-3,  $\beta$ -fructofuranosidase, invertase, neutral, characterization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060125)

\* Corresponding author. Tel: +86-771-3235706; E-mail: duliqin@gxu.edu.cn

Received: 13 August 2014 / Revised: 20 November 2014