

工业生物技术

菊粉酶基因的异源表达、分离纯化及酶学性质

李益民, 高教琪, 袁文杰, 相瑞娟, 侯胜博

大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

李益民, 高教琪, 袁文杰, 等. 菊粉酶基因的异源表达、分离纯化及酶学性质. 生物工程学报, 2015, 31(5): 670-681.

Li YM, Gao JQ, Yuan WJ, et al. Heterologous expression, purification and characterization of exo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YX01. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 670-681.

摘要: 为进一步提高菊粉酶在生物技术领域的应用, 研究了来源于马克斯克鲁维酵母 *Kluyveromyces marxianus* YX01 的菊粉酶性质。通过在毕赤酵母 GS115 宿主细胞中异源表达该菊粉酶基因 (*inu*), 获得了一种外切型菊粉酶, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证其分子量为 86.0 kDa。进一步在该菊粉酶上增加 6 个 His 标签, 采用聚乙二醇 (PEG) 20 000 透析浓缩和 Ni-NTA Agarose 静态亲和吸附作用的方法, 完成菊粉酶的分离纯化, 纯化倍数和酶回收率分别为 3.6 和 33.1%。比较发现粗酶液与纯酶的酶学性质相似, 且菊粉酶的最适反应温度为 60 °C, 最适 pH 值为 4.62, 并测得该酶的 K_m 和 V_{max} 值, 以菊粉为底物时, K_m 和 V_{max} 值分别为 80.53 g/L 和 4.49 g/(L·min); 以蔗糖底物时, K_m 和 V_{max} 值分别为 183.10 g/L 和 20.20 g/(L·min)。金属离子 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对酶活力具有不同程度的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 的抑制作用最为显著。这些研究为进一步提高菊粉酶在工业化的应用奠定了基础。

关键词: 马克斯克鲁维, 菊粉酶, 重组表达, 分离纯化, 酶学性质

Received: September 28, 2014; **Accepted:** November 26, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21106016), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. DUT14LK33).

Corresponding author: Wenjie Yuan. Tel/Fax: +86-411-84706308; E-mail: ywj@dlut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21106016), 中央高校基本业务费 (No. DUT14LK33) 资助。

网络出版时间: 2015-01-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150115.0927.003.html>

Heterologous expression, purification and characterization of exo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YX01

Yimin Li, Jiaoqi Gao, Wenjie Yuan, Ruijuan Xiang, and Shengbo Hou

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

Abstract: To improve the inulinase application in biotechnology, the characteristic of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YX01 was investigated. The *inu* gene of *K. marxianus* YX01 was transformed into *Pichiapastoris* GS115 host cells with molecular biology techniques. Then we achieved the heterologous expression of exo-inulinase whose molecular mass was about 86.0 kDa by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, six His-tag was added to the inulinase and a two-step method was applied in the purification of inulinase, including concentration via dialysis by polyethylene glycol 20 000 and metal Ni-NTA Agarose affinity adsorption. The purification factor of purified protein was 3.6 and the recovery rate of enzyme activity was 33.1%. We characterized the purified inulinase. The optimum temperature was 60 °C and pH was 4.62. When inulin and sucrose were used as substrates, the K_m and V_{max} values were 80.53 g/L vs 4.49 g/(L·min) and 183.10 g/L vs 20.20 g/(L·min), respectively. In addition, metal ions including Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} exhibited different degrees of inhibition on the enzyme activity, and Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} exhibited the most significant inhibition. Our findings might lay a good foundation for industrial application of inulinase.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, inulinase, heterologous expression, purification, enzymatic properties

菊粉存在于许多植物的根和块茎中(如菊芋、大丽花和菊苣),是一种具有代表性的非粮食作物^[1]。菊粉酶(Inulinase)是一类能够水解菊粉 β -2,1-D-果聚糖果糖糖苷键的水解酶^[2-4],根据对菊粉的作用方式,可分为内切型菊粉酶(Endoinulinase, EC 3.2.1.7)和外切型菊粉酶(Exoinulinase, EC 3.2.1.80)^[1,5-6]。内切型菊粉酶随机水解菊粉内部的 β -2,1-果聚糖果糖糖苷键,形成低聚三糖、四糖和五糖,主要水解产物是低聚果糖;外切型菊粉酶与菊粉分子链非还原性末端的糖苷键发生作用,逐个分离果糖单元,主要水解产物是果糖^[7-8]。内切型菊粉酶和外切型菊粉酶的区别常用 I/S 值的大小来作为酶学性质的指标,其中 I 是以菊粉为底物时的酶活, S

是以蔗糖为底物时的酶活。一般以 $I/S=1$ 作为区分界限,外切型菊粉酶的 I/S 值低(小于1),内切型菊粉酶的 I/S 值高(大于1)^[9-10]。

天然菊粉酶的产生菌株主要包括丝状真菌、酵母和细菌,如克鲁维酵母属 *Kluyveromyces*、曲霉属 *Aspergillus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、黄单胞菌属 *Xanthomonas* 和假单胞菌属 *Pseudomonas*。在这些微生物中,由于丝状真菌和酵母属的菊粉酶生产水平优于细菌,因此报道和研究较多的有乳酸克鲁维酵母 *Kluyveromyces lactis*^[11-12]、*K. marxianus*, 乳酒假丝酵母 *Candida kefyr*、德巴利酵母菌 *Debaryomyces cantarelli*、青霉菌属 *Penicillium* sp.和曲霉菌属 *Aspergillus* sp.等^[13-14]; 异源表达

菊粉酶的过程中,目的基因可来自于丝状真菌(例如:黑曲霉 *Aspergillus niger* inu-8)^[15]、酵母(例如: *K. lactis*)^[16]和细菌(例如:多粘芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9)^[11],从细菌克隆的菊粉酶基因也能像丝状真菌和酵母来源的一样,很好地其他工业菌种中表达。此外,毕赤酵母是菊粉酶异源表达中最常见的宿主菌株之一,目前研究较多的表达宿主 GS115、PMAD11、PMAD16、KM17、X-33、SMD1168等,均为野生型石油酵母 Y11430 突变产生,绝大多数是以甲醇作为唯一碳源的甲醇营养缺陷型酵母^[17]。最后,将异源菊粉酶基因通过不同的表达载体,如常用的酵母表达载体:整合型载体 (YIp) 和附加型载体 (YEp),转入到宿主菌株中,实现菊粉酶的异源表达。

国内外菊粉酶的研究方向主要包括产酶菌株的筛选、产酶条件的优化、诱导育种、菊粉酶的分离纯化以及利用微生物源菊粉酶生产超高果糖浆和生物乙醇发酵。目前,对菊粉酶及产生菌株的固定化技术和菊粉的水解工艺方向的研究也日益深入^[18]。菊粉酶以菊粉作为原料生产高果糖浆、低聚果糖、乙醇以及其他新型经济产品,在食品、医药、保健等领域具有广泛的应用价值和巨大的经济价值^[19-20]。然而,正常发酵条件下菊粉酶分泌表达不足或酶稳定性较差阻碍了其工业化生产的进程。

在前期的研究中,本实验室筛选得到一株马克斯克鲁维酵母 *K. marxianus* YX01,它是能发酵菊芋生产乙醇且具有耐热特性的优良菌株,可能存在性质不同的菊粉酶。因此,本文对该菊粉酶基因的克隆、异源表达、酶的分离

纯化和酶学性质进行研究,为进一步提高其在生物技术中的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂

马克斯克鲁维酵母 *K. marxianus* YX01 (ATCC8554,本实验室驯化保存);大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α (本实验室保存);毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 (本院杨青教授实验组赠予)。

YPD 培养基 (g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0; 若需要固体培养基则再加入 2.0% (W/V) 的琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

LB 培养基 (g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0; 若需要固体培养基则再加入 2.0% (W/V) 的琼脂, 121 °C 灭菌 20 min。

RDB 转化培养基: 超纯水 80 mL, 山梨醇 18.6 g (186 g/L), 琼脂粉 2.0 g (20 g/L); 121 °C 灭菌 20 min, 待温度降至 60 °C 后, 在超净工作台内加入 10 \times YNB 10.0 mL、10 \times D (20%葡萄糖) 10.0 mL、100 \times B (0.004%生物素) 1.0 mL、100 \times AA (0.5%各种氨基酸) 1.0 mL, 混匀倒平板。

BMGY 诱导表达培养基 (g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, K₂HPO₄ 3.0, KH₂PO₄ 11.8, 超纯水 885 mL; 121 °C 灭菌 20 min, 待温度降至 60 °C 后, 在超净工作台内加入 10 \times YNB 100.0 mL、100 \times B 5.0 mL、甘油 10.0 mL。

BMMY 诱导表达培养基 (g/L): 酵母提取物 10.0, 蛋白胨 20.0, K₂HPO₄ 3.0, KH₂PO₄ 11.8, 超纯水 890 mL; 121 °C 灭菌 20 min, 待温度降至 60 °C 后, 在超净工作台内加入 10 \times YNB

100.0 mL、100×B 5.0 mL、甲醇 5.0 mL。

PCR 产物纯化试剂盒 (Cycle-pure kit)、胶回收纯化试剂盒 (Gel extraction kit) 和质粒提取试剂盒 (Plasmid mini kit I), 均购自 Omega 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒, 购自北京 Solarbio 公司; 比利时进口菊粉聚合度为 10–20; 此外, *Bgl* II、*Not* I、*Xho* I、*rTaq* DNA 聚合酶、10×PCR 缓冲液、dNTP Mixture、T4 DNA 连接酶、10×T4 DNA 缓冲液、10×H 缓冲液、0.1% BSA 缓冲液、1 kb DNA ladder (Dye plus)、DL2 000 DNA marker 等分子试剂均购自 TaKaRa 公司; Ni-NTA Agarose, 购自 QIAGEN 公司; 其他试剂为国产分析纯以上。

1.1.2 仪器与设备

低温振荡培养箱 (ZQZY-70B, 上海知楚仪器); 酶标仪 (Thermo); 台式高速冷冻离心机 (Sigma 公司); 紫外投射反射仪 (上海精科实业有限公司); PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa 公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与 DNA 扩增

以 *K. marxianus* YX01 酵母基因组 DNA 作为模板, 以 IF (5'-CCGctcgagATGAAGTTCGCA TACTCC-3') 和 IR (5'-ATAAGAATgcgccgcTC AATGATGATGATGATGATGAACGTTAAATT GGGT-3') 为引物进行 PCR 扩增, 纯化回收 PCR 产物。其中引物 IF 和 IR 中, 小写斜体为引物的 *Xho* I 和 *Not* I 酶切位点, IR 上粗体标记了 6×His 标签用于后续的分选纯化。

1.2.2 构建重组载体与阳性转化子的筛选

将纯化后 PCR 产物与载体质粒 pPIC9 均用 *Not* I 和 *Xho* I 进行双酶切处理, 切胶纯化后使

用 T4 DNA 连接酶 16 °C 下过夜连接。热击法将重组质粒 pPIC9-inu 转化至大肠杆菌 DH5 α 细胞中, 测序验证。提取测序正确的重组质粒, 根据质粒上限制酶 *Bgl* II 的两个酶切位点, 获得线性重组质粒 pPIC9-inu, 并通过电击转化法转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 温育 5 h 后涂布于 RDB 平板, 30 °C 倒置培养 2 d。

同时, 由于毕赤酵母 GS115 为组氨酸缺陷型, 而载体上带有 *his4* 基因, 两者均不能单独在 RDB 转化平板 (无 His) 上生长, 只有整合的转化子才可以生长的原理, 进行转化子的第一次筛选。且由于外源基因的整合, 阳性转化子利用甲醇的能力降低, 利用阳性转化子在以甲醇为唯一碳源的培养基上生长缓慢或不能正常生长的原理, 从 RDB 转化平板上挑取单菌落分别用无菌牙签接种到 MD 和 MM 选择培养基上, 筛选能在 MD 选择培养基上正常生长, 但是在 MM 选择培养基上不能生长或生长缓慢的阳性转化子, 并进行 PCR 验证。

1.2.3 菊粉酶的异源表达与分离纯化

将 PCR 鉴定正确的阳性转化子接种到 50 mL 的 BMGY 增殖培养基中 (250 mL 三角瓶盛装), 30 °C、150 r/min 培养 2 d 后, 离心收集细胞, 按照 20% 的接种量接种到 100 mL 的 BMMY 诱导培养基中, 30 °C、150 r/min 诱导培养, 每间隔 12 h 取样, 测发酵液生物量、蛋白浓度, 以及采用 DNS 法在 OD_{540} 吸光值条件下测菊粉酶酶活, 并每间隔 24 h 补加 1% 的甲醇 (已过膜除菌)。发酵 192 h 后终止发酵, 使用低温冷冻离心机 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集发酵上清液。

将适当的上清液加入透析袋内, 利用聚乙

二醇 (PEG 20 000) 的吸水作用, 浓缩液体。然后, 采用 Ni-NTA Agarose 静态亲和吸附法分离纯化菊粉酶: 利用菊粉酶的 His 标签与 Ni-NTA Agarose 之间的亲和作用, 使其吸附在 Ni-NTA Agarose 上, 缓冲液洗脱杂蛋白后, 再用高咪唑浓度的洗脱液少量多次洗脱得到菊粉酶的单一纯酶溶液。

1.2.4 SDS-PAGE 与菊粉酶活性的测定

采用 SDS-PAGE 测定菊粉酶分子质量, 使用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 浓缩胶电泳条件: 80 V, 50 min, 分离胶电泳条件: 120 V, 60 min。考马斯亮蓝染色 3 h, 用脱色液过夜脱色。

研究该菊粉酶的酶切作用方式: 取 50 μL 洗脱液 (纯菊粉酶), 加入 450 μL 5% 菊粉溶液 (0.1 mol/L HAc-NaAc, pH 4.6 缓冲液) 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min 后, 立即沸水浴 5 min 灭活, 采用 DNS 法测定还原糖的含量 (mg); 取 50 μL 洗脱液 (纯菊粉酶) 沸水浴 5 min 灭活, 同上条件反应作对照组。用 I 表示, 以菊粉为底物时, 每分钟产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。用 5% 蔗糖溶液代替 5% 菊粉溶液, 在相同条件下, 同上反应。用 S 表示, 以蔗糖为底物时, 每分钟产生 1 μmol 还原糖所需要的酶量。

1.2.5 菊粉酶的最适温度及热稳定性

实验组: 向 50 μL 酶液中加入 450 μL 5% 菊粉溶液 (0.1 mol/L HAc-NaAc, pH 4.6 缓冲液) 分别置于不同温度 (30–80 $^{\circ}\text{C}$) 的水浴锅中反应 10 min 后, 立即沸水浴 5 min 灭活, 测定不同温度下的酶活; 对照组: 取 50 μL 酶液沸水浴 5 min 灭活, 反应条件同上。此外, 将酶液分别在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中保温 30 min 后, 立即

冰浴冷却, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 测定不同温度下的残留酶活, 以 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存的酶活力为 100%, 求出其他温度的相对残留酶活。

1.2.6 菊粉酶的最适 pH 及酸碱稳定性

实验组: 分别用 pH 2.81、3.68、3.92、4.72、5.72 (0.2 mol/L HAc-NaAc 缓冲液) 和 6.12、7.15、8.20 (0.2 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液) 配制 5% (W/V) 菊粉溶液, 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 测定不同 pH 值条件下的酶活; 对照组: 取 50 μL 酶液沸水浴 5 min 灭活, 反应条件同上。将酶分别在上述 pH 值的缓冲液中 30 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 后, 测定其残余酶活力, 以未保温酶液的酶活力作为 100%。

1.2.7 金属离子对酶活力的影响

向酶反应体系中加入不同的金属离子, 使其终浓度达到 10 mmol/L, 并以未加金属离子 (用相同体积的双蒸水代替) 处理酶的酶活力为 100%, 求出加入不同金属离子后的相对残留酶活。

1.2.8 菊粉酶对菊粉和蔗糖底物的催化动力学

本实验采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测定 K_m 和 V_{\max} 值, 根据米氏方程的双倒数表达式 (1):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

以 $1/[S]$ 为横坐标, 以 $1/v$ 为纵坐标作图, 得到一条直线。根据直线的纵截距可求出 V_{\max} 值, 再由斜率计算得到 K_m 值。以菊粉和蔗糖分别作为底物, 在不同的底物浓度 (2%、3%、4%、5%、6%、7%、10% 0.1 mol/L HAc-NaAc) 以及最适反应温度和最适 pH 值的条件下反应 10 min, 测定反应产物中还原糖的增加量, 并规

定酶反应的初始速率为产物在单位时间内还原糖的增加量^[21]。

2 结果与分析

2.1 菊粉酶基因表达载体的构建

首先以 *K. marxianus* YX01 酵母的基因组为模板, IF/IR 为引物扩增出菊粉酶基因 (*inu*), 大小约为 1.7 kb, 与 NCBI 所公布的菊粉酶基因 (GenBank Accession No. EU719651) 大小一致; 然后, 将 *Not* I 和 *Xho* I 双酶切纯化后的目的基因 (*inu*) 与质粒 pPIC9 连接, 并热击转化至大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 提取重组质粒, 进行菌液 PCR、双酶切验证和测序, 结果如图 1 所示, 证明表达载体构建成功。

2.2 表达载体的转化与转化子验证

将切胶回收的限制酶 *Bgl* II 单酶切重组质粒 pPIC9-*inu* 线性片段, 电转至毕赤酵母 GS115 感受态细胞中, 温育 5 h 后涂布于 RDB 转化平板, 30 °C 倒置培养 2 d。结果发现实验组的 RDB 转化平板上有若干单菌落生长, 阴性对照组 (只

有 GS115 感受态细胞) 的 RDB 转化平板上无单菌落生长, 证明重组质粒的线性片段已整合到酵母基因组上。

从 RDB 转化平板上挑取单菌落分别用无菌牙签接种到 MD 和 MM 选择培养基上, 并挑取在 MD 选择培养基上正常生长, 而在 MM 选择培养基上不生长或生长缓慢的转化子, 接种到 YPD 液体培养基中, 30 °C、150 r/min 培养 20 h 后, 提取其基因组并进行 PCR 验证, 结果如图 2 所示, 阴性对照 (PCR 验证反应体系中不加基因组模板而加 ddH₂O) 无目的条带; 实验组 4-10 号未验证出结果, 说明筛选获得的转化子中存在一定的假阳性; 阳性对照 (PCR 验证反应体系中以 *K. marxianus* YX01 基因组为模板) 和实验组 3、11、12 号 PCR 验证出目的条带, 完成了阳性转化子的筛选和鉴定。

2.3 菊粉酶的诱导表达及分子量

将 PCR 验证正确的阳性转化子, 在用 BMGY 培养基 30 °C 增殖培养 2 d 后, 离心收集菌体换 BMMY 诱导培养基培养 (平行实验), 每

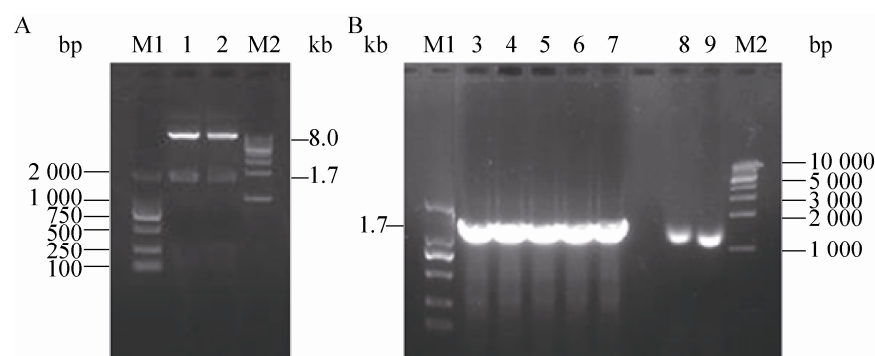


图 1 重组质粒的双酶切验证及抗性菌株的 PCR 验证

Fig. 1 Double digestion of recombinant plasmid and PCR product of resistant *E. coli*. (A/B) M1: DNA marker DL2 000; 1-2: recombinant plasmid digested; 3-7: PCR product of bacteria; 8-9: positive control, PCR product using the genome of *K. marxianus* YX01; M2: 1 kb DNA ladder (Dye Plus).



图2 重组酵母的PCR验证

Fig. 2 PCR products of combination strains. M1: DNA marker DL2 000; 1: positive control, PCR product using the genome of *K. marxianus* YX01; 2: negative control, PCR product using the ddH₂O; 3-12: PCR products of transformants' genome.

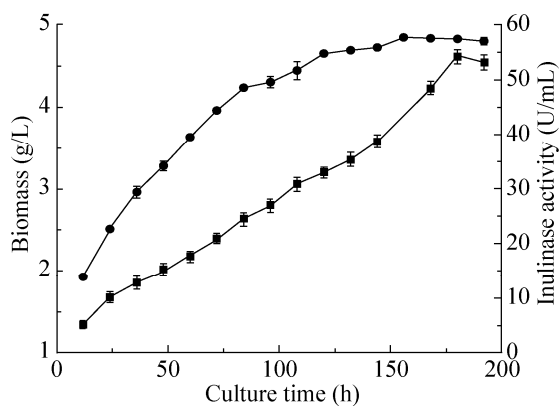


图3 生物量与酶活力随时间的变化曲线

Fig. 3 The curve of biomass (■) and inulinase activity (●) with time.

间隔 12 h 取样一次, 每间隔 24 h 补加 1% 的甲醇, 诱导培养 8 d 后, 终止发酵收集上清液。用 0.1 mol/L 的柠檬酸钠 10 倍稀释发酵液, OD_{620} 测量生物量, 用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒稀释后测发酵结束后的蛋白浓度, 采用 DNS 法测发酵液酶活, 每单位菊粉酶酶活力定义为: 以菊粉为底物, 在 pH 4.6 (0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液)、60 °C 的反应条件下, 每分钟内产生 1 μ mol 果糖所需要的酶量, 即定义为一个酶活

力单位 (U)。粗酶发酵上清液液生物量和酶活力随时间的变化曲线, 结果如图 3 所示, 菌体的生物量在 156 h 后 OD_{620} 达到峰值为 4.84; 菊粉酶酶活力在用 1% 甲醇连续诱导 180 h 后达到峰值为 54.91 U/mL, 计算求得粗酶液中菊粉酶的最高比活力为 2 614.76 U/mg。根据组成菊粉酶的各种氨基酸分子量计算, 菊粉酶的理论分子量为 65.0 kDa。而 SDS-PAGE 结果显示纯菊粉酶的分子量大小约为 86.0 kDa, 结果如图 4 所示。分析认为, 菊粉酶分子量的增加很可能是由于其序列中存在一些糖基化位点, 因而在毕赤酵母表达系统中出现大量的糖基化修饰 (包括 N-糖基化和 O-糖基化) 导致电泳图中目的条带较宽, 菊粉酶分子量增加, 使得在 SDS-PAGE 中迁移速率改变。

2.4 菊粉酶的分离纯化及酶切性质

本实验中分离纯化粗酶液中菊粉酶的步骤简便快捷, 采用两步法即可获得高比活力的菊

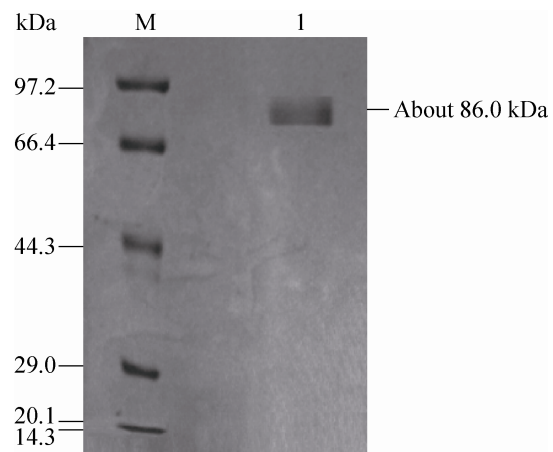


图4 重组蛋白的SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein. M: molecular mass standards (kDa); 1: purified inulinase.

粉酶。首先,通过聚乙二醇 (PEG 20 000) 透析浓缩粗酶液,将 250 mL 的粗酶液浓缩至 40 mL,浓缩倍数为 6.25,由于透析袋的孔径大小为 8 000,分子量小于 8 000 的杂蛋白可以透过,所以也能够起到去除杂蛋白的作用。然后,通过 Ni-NTA Agarose 静态亲和吸附的方式吸附菊粉酶蛋白^[22],去除了所有的残余杂蛋白,洗脱后完成了对菊粉酶的纯化。在浓缩过程中,几乎没有目标蛋白的损失,浓缩前总酶活为 13 750.0 U,浓缩后总酶活为 13 200.0 U,酶回收率为 96.0%;纯化前菊粉酶的比活力为 2 632.1 U/mg,而纯化后菊粉酶的比活力为 9 448.1 U/mg,纯化倍数为 3.6;取 5 mL 浓缩液加入 5 mL 缓冲液稀释后的总酶活为 1 650.0 U,吸附纯化后测得总酶活为 546.0 U,因此最终酶回收率为 33.1%。

研究菊粉酶的作用方式通常是以 I/S 值作为区分依据,本实验分别以菊粉和蔗糖为底物,测得菊粉酶的 I/S 值为 0.436 (<1),因此属于外切型菊粉酶。

2.5 温度对菊粉酶活性的影响

本实验设立不同的温度梯度 (30–80 °C),与 5% 菊粉溶液 (0.1 mol/L HAc-NaAc, pH 4.6 缓冲液) 反应 10 min。结果如图 5 所示,菊粉酶纯酶的最佳反应温度是 60 °C。将酶液分别置于 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 的水浴锅内保温 30 min,再与 5% 菊粉溶液 (0.1 mol/L HAc-NaAc, pH 4.6 缓冲液) 60 °C 反应 10 min,测定温度对酶热稳定性的影响,结果如图 5 所示,菊粉酶纯酶在 30–50 °C 之间热稳定性较好,30 °C、40 °C 下保温 30 min,分别能保

留 99.9% 和 87.7% 的酶活力,在 40 °C 下保温 100 min,仍能保留 46.4% 的酶活力;但是,一旦温度超过 50 °C,该菊粉酶的热稳定性迅速下降直至基本丧失活性,60 °C 下保温 30 min 后,残余酶活力不足 10.0%。此外,将少量酶置于 4 °C 保存 25 d 后,酶活不损失,因此该酶可以在较低温度下长时间保存。

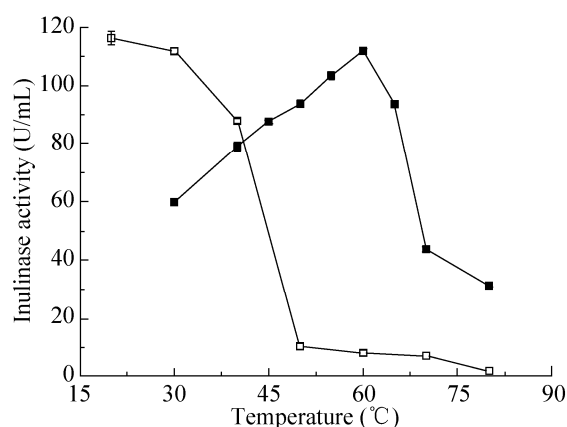


图 5 温度对酶活性与酶稳定性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on activity of inulinase (■) and stability of inulinase (□).

2.6 pH 对菊粉酶活性的影响

在最适反应温度为 60 °C 的反应条件下,将酶液与菊粉分别在不同 pH 值 (2.81、3.68、3.92、4.62、5.72、6.12、7.15、8.20) 的 0.2 mol/L 缓冲液中反应 10 min,测定该菊粉酶的最适 pH 值,结果如图 6 所示,最适 pH 值为 4.62。当 pH 高于或低于 4.62 时,菊粉酶的活性迅速降低。同时,研究发现 pH 对酶稳定性的影响较小,在 pH 4.60–5.20 范围内,酶稳定性更佳。

2.7 金属离子对菊粉酶活性的影响

金属离子对该菊粉酶酶活力的影响如图 7

所示。从图中可知, K^+ 和 Mg^{2+} 对酶活力没有明显的影响; 而金属离子 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对菊粉酶活力具有不同程度的抑制作用, 其中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 的抑制作用最为显著。

2.8 菊粉酶的 K_m 和 V_{max} 值

本实验分别以菊粉和蔗糖作为底物, 在最适温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 、最适 pH 值为 4.62 的反应条件

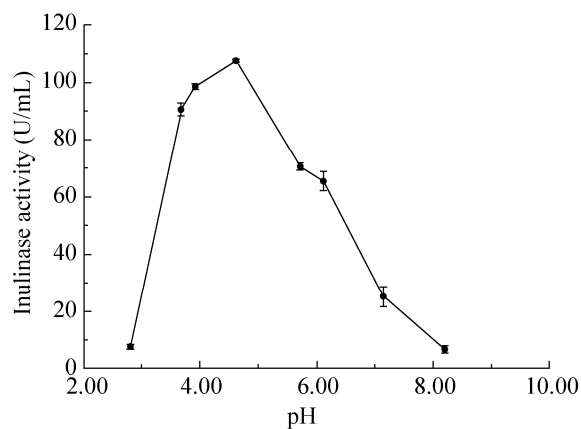


图 6 pH 对酶活性的影响

Fig. 6 Effect of pH on activity of inulinase.

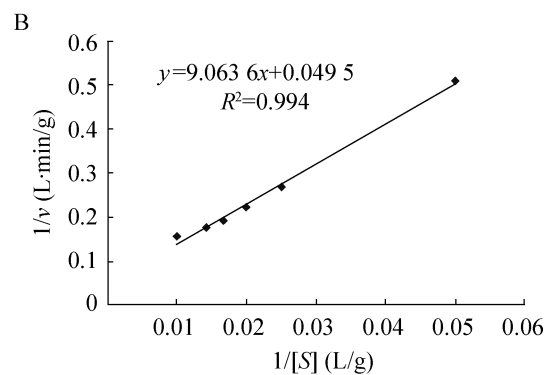
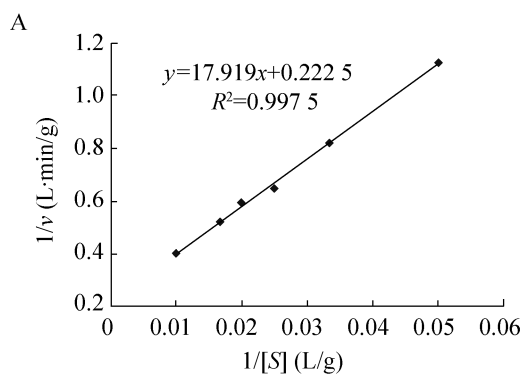


图 8 菊粉酶的 $1/v$ 和 $1/[S]$ 关系图 (A: 菊粉作为底物; B: 蔗糖作为底物)

Fig. 8 The relationship between reciprocal value of v and $[S]$ on purified inulinase. (A) Inulin as substrates. (B) Sucrose as substrates.

下, 与不同浓度的底物 (2%、3%、4%、5%、6%、7%、10% 0.1 mol/L HAc-NaAc) 反应 10 min, 测出了产物中还原糖的增加量, 结果如图 8 所示, 并根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法测定 K_m 和 V_{max} 值, 其中 K_m 值分别为 80.53 g/L 和 183.10 g/L , V_{max} 值分别为 $4.49\text{ g/(L}\cdot\text{min)}$ 和 $20.20\text{ g/(L}\cdot\text{min)}$ 。

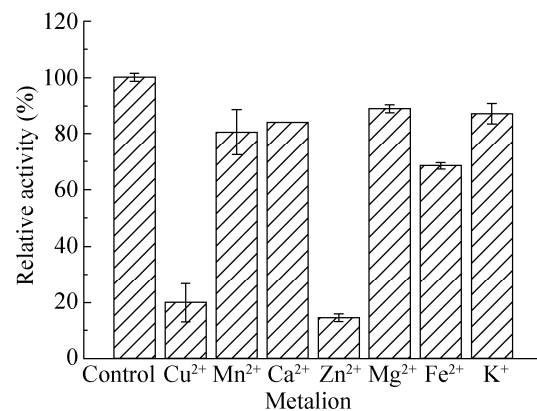


图 7 金属离子对酶活力的影响

Fig. 7 Effect of metalion on activity of inulinase.

3 讨论

通过分子生物学手段扩增了 *K. marxianus* YX01 菊粉酶基因 (*inu*), 并构建了重组基因表达载体, 实现了菊粉酶基因的异源表达。本研究所得菊粉酶的氨基酸序列, 用 Clustal X 软件与其他文献报道序列比对分析, 发现该菊粉酶具有与它们相一致的菊粉酶保守序列 (WMNXPNGL) 和 (RDPKVF)^[24]。本实验为了后续分离纯化实验, 导入了 6 个 His 标签, 发酵过程中检测到酶活力, 说明 His 标签并不影响酶的活性; 在诱导表达过程中, 菊粉酶分泌表达量达到最高时的诱导时间天数为 7 d, 之后由于培养基内营养物质的缺乏, 有毒物质的逐渐积累, 菌体逐渐死亡, 酶活力在从 8 d 开始降低。和其他菊粉酶异源表达研究文献相比较, 本实验中菌体生物量和酶活力达到峰值所需的诱导时间较长, 分析认为, 可能与发酵过程中培养基配方、摇床转数、摇瓶大小和发酵液体积等因素有关, 后续应优化培养条件, 实现菊粉酶的快速分泌表达。

在酶的分离纯化过程中, 通过两步法便捷的获得了菊粉酶的纯酶液, 纯化倍数为 3.6, 最终酶回收率为 33.1%。经 SDS-PAGE 验证, 菊粉酶分子量增加, 分析认为可能是由于多糖基化修饰作用的影响。对菊粉酶的酶学性质的结果表明该酶为外切型菊粉酶, 最适温度为 60 °C, 最适 pH 值为 4.62, 并测得该酶的 K_m 和 V_{max} 值, 以菊粉为底物时, K_m 和 V_{max} 值分别为 80.53 g/L 和 4.49 g/(L·min); 以蔗糖底物时, K_m 和 V_{max} 值分别为 183.10 g/L 和 20.20 g/(L·min)。孔令坚等^[25]和熊伍平等^[26]报道, 金属离子

Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 以及 K^+ 对菊粉酶的酶活力具有显著的促进作用, 但本实验中这些金属离子对菊粉酶未发现明显的促进作用; 而金属离子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对该菊粉酶酶活力具有显著的抑制作用, 与报道结果相一致。同时, 与已报道的马克斯克鲁维酵母 DSM 5418 菊粉酶 (编码基因 GenBank Accession No. JQ411233) 相比, 两者基因同源性达到 99%, 来源于 *K. marxianus* YX01 菊粉酶基因仅在第 73、211 和 400 位的氨基酸发生突变, 但菊粉酶最适反应温度较高, 最适 pH 值低, 因而推测这 3 个突变的氨基酸影响了菊粉酶的酶学性质, 使得该菊粉酶在高温、低 pH 的生产条件下具有更加良好的应用性。但研究发现, 该酶的热稳定性较差, 超过 50 °C 以后酶活性迅速下降, 这可能是导致其酶活力偏低, 制约其工业化生产的关键因素。

REFERENCES

- [1] Gao J, Xu YY, Yang HM, et al. Gene cloning, expression, and characterization of an exo-inulinase from *Paenibacillus polymyxa* ZJ-9. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(6): 1419–1430.
- [2] Gong F, Zhang T, Chi Z, et al. Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the purified inulinase. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2008, 13(5): 533–539.
- [3] Wang L, Huang Y, Long X, et al. Cloning of exoinulinase gene from *Penicillium janthinellum* strain B01 and its high-level expression in *Pichia pastoris*. *J Appl Microbiol*, 2011, 111(6): 1371–1380.
- [4] Seok-Hwan L, Hongweon L, Dai-Eun S, et al. Recombinant production of an inulinase in a

- Saccharomyces cerevisiae* gal80 strain. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(11): 1529–1533.
- [5] He M, Wu D, Wu J, et al. Enhanced expression of endoinulinase from *Aspergillus niger* by codon optimization in *Pichia pastoris* and its application in inulooligosaccharide production. J Ind Microbiol Biotechnol, 2014, 41(1): 105–114.
- [6] Coitinho JB, Guimarães VM, de Almeida MN, et al. Characterization of an exoinulinase produced by *Aspergillus terreus* CCT 4083 grown on sugar cane bagasse. J Agric Food Chem, 2010, 58(14): 8386–8391.
- [7] Yuan B, Hu N, Sun J, et al. Purification and characterization of a novel extracellular inulinase from a new yeast species *Candida kutaonensis* sp. nov. KRF1T. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96(6): 1517–1526.
- [8] Chen XM, Chen HQ, Chen TX, et al. Enzymatic properties and molecular biology of inulinase. J Food Sci Biotechnol, 2009, 28(5): 577–588 (in Chinese).
陈晓明, 陈寒青, 陈天祥, 等. 菊粉酶的酶学特性与分子生物学. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 577–588.
- [9] Jiu M, Wang LJ. Purification and enzymatic properties of inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. Food Sci, 2010, 31(3): 198–202 (in Chinese).
纠敏, 汪伦记. 马克斯克鲁维酵母菊粉酶的分离纯化和酶学性质研究. 食品科学, 2010, 31(3): 198–202.
- [10] Wang J, Jin ZY. The research development on production of inulinase from microorganism. Biotechnology, 2002, 12(2): 42–45 (in Chinese).
王静, 金征宇. 微生物菊粉酶的研究进展. 生物技术, 2002, 12(2): 42–45.
- [11] Liu GL, Chi Z, Chi ZM. Molecular characterization and expression of microbial inulinase genes. Crit Rev Microbiol, 2013, 39(2): 152–165.
- [12] Yu J, Jiang JX, Fang Z, et al. Enhanced expression of heterologous inulinase in *Kluyveromyces lactis* by disruption of *hap1* gene. Biotechnol Lett, 2010, 32(4): 507–512.
- [13] Rocha J R, Catana R, Ferreira BS, et al. Design and characterisation of an enzyme system for inulin hydrolysis. Food Chem, 2006, 95(1): 77–82.
- [14] Kalil S J, Maugeri-Filho F, Rodrigues MI. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. Process Biochem, 2005, 40(2): 581–586.
- [15] Wang JH, Wu YB, Li GL, et al. Enzymatic characteristics of inulinase from *Aspergillus niger* inu-8. Hubei Agric Sci, 2009, 48(10): 2414–2417 (in Chinese).
王建华, 吴艳兵, 李广领, 等. 一株黑曲霉菌株所产菊粉酶的酶学性质. 湖北农业科学, 2009, 48(10): 2414–2417.
- [16] Yu J. Expression and application of inulinase from *Kluyveromyces cicerisporus*[D]. Shanghai: Fudan University, 2010 (in Chinese).
俞静. 鹰嘴豆孢克鲁维酵母菊粉酶的分泌表达与应用研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [17] Zhang LJ. Molecular cloning of inulinase gene and expression in *Pichia pastoris*[D]. Ji'nan: Shandong University, 2012 (in Chinese).
张丽娟. 菊粉酶基因克隆及在毕赤酵母中表达[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [18] Zheng ZH, Liu YY, Cai WZ, et al. Screening of yeast strains for inulinase production and fermentation conditions. J Xiamen Univ: Nat Sci Ed, 1993, 32(3): 360–364 (in Chinese).
郑忠辉, 刘月英, 蔡文铮, 等. 菊粉酶高活力菌株的筛选和发酵条件的研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 1993, 32(3): 360–364.
- [19] Chen XM, Xu XM, Jin ZY, et al. Expression of an exoinulinase gene from *Aspergillus ficuum* in *Escherichia coli* and its characterization.

- Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1984–1990.
- [20] Li Y, Liu GL, Chi ZM. Ethanol production from inulin and unsterilized meal of Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces* sp. W0 expressing the endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. *Bioresour Technol*, 2013, 147: 254–259.
- [21] Gao W. Screening of thermo-stable bacteria and characterization of inulinase[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2008 (in Chinese).
高威. 产菊粉酶耐热细菌的筛选及酶学性质研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [22] Wan W, Wang DM, Gao XL, et al. Expression of family 3 cellulose-binding module (CBM3) as an affinity tag for recombinant proteins in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(3): 789–798.
- [23] Wang JH. Review on gene structure, enzymology, fermentation and application studies on microorganism inulinase. *Nat Prod Res Dev*, 2001, 13(1): 83–89 (in Chinese).
王建华. 微生物菊粉酶基因结构、酶学性质与应用研究进展. 天然产物研究与开发, 2001, 13(1): 83–89.
- [24] Zhang T, Gong F, Chi Z, et al. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(1): 13–22.
- [25] Kong LJ, Shi Y, Chen X. Enzymatic properties of inulinase from *Kluyveromyces* S120. *Food Res Dev*, 2012, 33(5): 165–167 (in Chinese).
孔令坚, 石勇, 陈雄. 克鲁维酵母菊粉酶的酶学特性研究. 食品研究与开发, 2012, 33(5): 165–167.
- [26] Xiong WP, Wang CH, Lu Y, et al. Cloning, expression and characterization of exo-inulinase from *Kluyveromyces marxianus* DSM 5418. *Chin J Bioprocess Eng*, 2013, 11(3): 40–45 (in Chinese).
熊伍平, 王成华, 陆雁, 等. 一个外切菊粉酶基因的克隆表达及酶学性质. 生物加工过程, 2013, 11(3): 40–45.

(本文责编 郝丽芳)