IPTG与乳糖联合诱导重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶表达

李攀峰，张洪斌*，胡雪芹
（合肥工业大学医学工程学院制药工程系，安徽 合肥 230009）

摘 要：研究异丙基硫代-*β*-*D*-吡喃半乳糖苷（isopropyl-*β*-*D*-1-thiogalactopyranoside，IPTG）与乳糖联合诱导重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶表达的效果。在利用IPTG和乳糖分别作为诱导剂对右旋糖酐蔗糖酶工程菌*Escherichia coli* BL21（DE3）/pET28-dexYG进行诱导表达的基础上，尝试将此两种诱导剂联合使用，在降低成本的同时获得较好的表达效果。在获得最佳培养基的基础上，考察菌体IPTG与乳糖的联合加入量、菌体浓度、诱导时间对右旋糖酐蔗糖酶表达的影响。在菌浓（$OD_{600\,nm}$）达到3.0时，加入0.1 mmol/L IPTG 95 μL＋2.5 g/L乳糖，25 ℃混合诱导培养4 h，酶活力最高，达到40.44 U/mL。IPTG与乳糖联合诱导重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶表达可行。

关键词：异丙基-*β*-*D*-硫代吡喃半乳糖苷；乳糖；右旋糖酐蔗糖酶；表达；联合诱导

Combinatorial Induction of Recombinant Dextransucrase Expression in *E. coli* by IPTG and Lactose

LI Pan-feng, ZHANG Hong-bin*, HU Xue-qin
(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Medical Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In order to explore the combinatorial induction of recombinant dextransurase experssion in *E. coli* by isopropyl *β*-*D*-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and lactose, a mixture of IPTG and lactose was added to the cell culture to induce the expression of recombinant dextransurase. Based on the optimal culture medium, IPTG concentration and the amount of lactose added, bacteria concentration and induction time revealed significant impacts on the enzyme activity. The results showed that the optimal concentrations of IPTG and lactose were 0.1 mmol/L and 2.5 g/L, respectively, and optimal induction time was 4 h at 25 ℃. Under these culture conditions, the activity of dextransucrase could reach up to 40.44 U/mL. The combinatorial induction of recombinant *E. coli* dextransurase by IPTG and lactose was feasible, greatly reducing the dosage of IPTG and industrial production costs.

Key words: isopropyl-*β*-*D*-1-thiogalactopyranoside (IPTG); lactose; dextransucrase; expression; combinatorial induction
中图分类号：Q814 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2014)01-0185-04
doi:10.7506/spkx1002-6630-201401036

右旋糖酐蔗糖酶（dextransucrase，DSR，EC2.4.1.5）属于糖苷水解酶第70家族，是一种葡聚糖蔗糖酶（又称葡萄糖基转移酶，glucosyhransferase，简称GTF），是葡聚糖蔗糖酶领域中研究较早较热门的一类酶[1-2]。该酶的催化是以蔗糖为底物，切断*D*-葡萄糖基与果糖基的糖苷键，并形成*D*-葡萄糖基与酶的复合物，释放出果糖，然后将葡萄糖基单元以*α*-1,6或其他糖苷键的形式连接起来，生成两类重要产品：右旋糖酐和果糖[3]。

果糖在食品行业中有着广泛的应用。果糖具有优越的代谢性能，其代谢过程不依赖胰岛素[4]，不会引起血糖、胰岛素、胰高血糖素的较大变化[5]，因此常被作为糖尿病人的甜味食品[6]。果糖代谢不会产生乳酸，能对体内消耗蛋白质有抑制作用，能够迅速提高并且补充人体所需的能量，使得人体耐力以及代谢得到强化，因此常被制作为功能性饮料，为运动员及体力劳动者快速恢复体力[7]；果糖因其爽口，风味好、温和无异味、透明度好被大量用于软饮料产品，如可乐型饮料、汽水、果汁饮料、果露等。果糖入口后不残留，有水果的优质甜味，也能增强果香，在发酵型烘焙食品

收稿日期：2013-04-06
基金项目：安徽省长三角科技攻关基金项目（10140702001）；安徽省自主创新专项（2013AKKG0391）
作者简介：李攀峰（1988—），男，硕士研究生，研究方向为酶与制药工程。E-mail：395427915@qq.com
*通信作者：张洪斌（1970—），男，教授，博士，研究方向为酶与制药工程。E-mail：zhb5678@163.com

中果糖的发酵性、焦化性及保湿性可以作为优点发挥出来。并在产品的销售过程中有效地防止产品发干、变硬，发霉等[8]。关键酶右旋糖酐蔗糖酶的研究也越来越受到研究人员的重视。Tsuchiya等[9]报道右旋糖酐蔗糖酶摇瓶培养较静止培养时酶活力高。AIsop[10]报道在空气搅动的情况下右旋糖酐蔗糖酶的酶活力也高于无氧或纯氧的条件。Veljkovic等[11]研究证明当生物反应器中气体流量与菌体最大耗氧量一致时酶活力最高。Lazic等[12]发现*L. mesenteroids* ZDRAVLJE SR-P在pH5.5，搅拌速率200 r/min；进气流速0.05 vvm时，酶活力最高34 DSU/mL。变旋糖酐蔗糖酶受3-脱氧-3-氟-*α*-*D*-呋喃葡萄糖、2-氨基乙醇的抑制[13]。

基因工程技术的发展使右旋糖酐蔗糖酶工程菌的构建和表达研究的发展加快。Wilke-Douglase等[14]首次从*L. mesenteroids* NRRL B2512F克隆得到右旋糖酐蔗糖酶基因*darS*，通过巨大芽孢杆菌表达所获得的右旋糖酐蔗糖酶酶活力为0.065 U/mL，经过高密度培养后酶活力高达28.6 U/mL[15]。2006年国外有报道通过克隆*darS*在大肠杆菌中表达，采用0.2 mmol/L 异丙基硫代-*β*-*D*-呋喃半乳糖苷（isopropyl *β*-*D*-1-thiogalactopyranoside，IPTG）作为诱导剂，获得的右旋糖酐蔗糖酶活力达到5.85 U/mL[16]。不过IPTG价格昂贵，使用量过多时有毒性，并且提高了工业生产成本。因此研发1种降低IPTG使用量的诱导方法具有重要意义。

本实验室通过分子生物学技术成功构建右旋糖酐蔗糖酶工程菌株*E. coli* BL21（DE3）/pET28-dexYG, 并分别利用IPTG和乳糖作为诱导剂对其进行诱导表达，并利用两种诱导剂进行联合诱导研究，在降低成本的同时获得较好的表达效果，为该酶的工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

基因工程菌*Escherichia coli* BL21（DE3）/pET28-dexYG由本实验室构建、保存。

卡纳霉素 上海捷瑞生物工程有限公司；IPTG 德国默克公司；其他常用试剂均为分析纯。

1.2 培养基

LB液体培养基（g/L）：胰蛋白胨10、酵母提取物5、氯化钠10，pH 7.0。

发酵培养基：蛋白胨10 g/L、硝酸钾10 g/L、$MgSO_4$（1mol/L）100 μL/L、甘油（500 g/L）10 mL/L、M9盐90 mL/L，pH 7.0。其中M9盐配方：磷酸氢二钠17.105 g/200 mL、磷酸二氢钾3 g/100 mL、氯化铵1 g/100 mL。

1.3 仪器与设备

SL202N电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司；WH-861旋涡混合器 太仓市科教仪器厂；W-1调节万用电炉 通州市沪通实验仪器厂；TG16-WS台式高速离心机 长沙湘仪离心机有限公司；GL-20G-II高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂；PHS-3CT酸度计 上海大中分析仪器厂；CHA-SA气浴恒温摇床 江苏金坛国胜实验仪器厂；LS-B50L立式圆形压力蒸汽灭菌器 张家港市化菱医疗设备有限公司；KS-150超声波细胞粉碎机 宁波科生仪器厂；VIS-723紫外分光光度计 上海精密科学仪器有限公司；MDF-U332医用低温冰箱（－50 ℃） 日本三洋公司；HH-2恒温水浴锅 江苏金坛晶玻实验仪器厂；微量移液器 上海大龙医疗设备有限公司。

1.4 方法

1.4.1 右旋糖酐蔗糖酶的表达培养

将基因工程菌BL21（DE3）/pET28-dexYG于37 ℃、含50 mg/mL卡那霉素的LB培养基中进行过夜富集培养[17-18]。将过夜富集培养后的菌液按照1%的接种量接种到100 mL含卡那霉素50 μg/mL的培养基中进行发酵，37 ℃、250 r/min培养直到菌浓（$OD_{600\,nm}$）达到1.8时，加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L，25 ℃、250 r/min诱导4 h来使得右旋糖酐酶表达，离心取菌体。

1.4.2 右旋糖酐蔗糖酶的酶活力测定

方法参照文献[19]。酶活力单位（U）定义：在25 ℃条件下，1 mL底物反应液中1h催化蔗糖产生0.1 mg果糖所需要的酶量。

1.4.3 IPTG和乳糖联合诱导

将实验分成A、B、C、D组，4组均为发酵培养基，其中，A、B两组为IPTG与乳糖联合诱导，C组IPTG单独诱导D组乳糖单独诱导A和C组到$OD_{600\,nm}$=2.0时开始进行诱导，B和D两组到$OD_{600\,nm}$=3.0开始诱导。A、B两组均为125 μL 0.1 mmol/L IPTG+2.5 g/L乳糖混合诱导，C组为250 μL 0.1 mmol/L的IPTG单独诱导，D组为2.5 g/L乳糖单独诱导；A、B两组在诱导3、4、5、6、7 h时分别取样15 mL测酶活力，C组诱导4 h后测定酶活力，D组诱导6 h后测酶活力。

1.4.4 IPTG和乳糖联合诱导条件优化

1.4.4.1 乳糖添加量对诱导过程的影响

将实验分成A、B、C、D、E、F共6组，分别按照发酵培养基成分进行配制。A、C、E组在$OD_{600\,nm}$=2.0时开始进行诱导，B、D、F组在$OD_{600\,nm}$=3.0开始诱导。其中A、B两组加入60 μL 0.1 mmol/L IPTG＋1.25 g/L乳糖混合诱导，C、D两组加入60 μL 0.1 mmol/L IPTG＋2.5 g/L乳糖混合诱导，E、F两组加入60 μL 0.1 mmol/L IPTG＋5.0 g/L乳糖混合诱导。A、C、E 3组在菌浓$OD_{600\,nm}$=2.0时开始诱导，B、D、F 3组在菌浓$OD_{600\,nm}$=3.0时开始诱

导。4组均在诱导3、4、5、6、7 h时分别取样15 mL测定酶活力。

1.4.4.2 IPTG含量对诱导过程的影响

实验过程同1.4.4.1节，将A、C组在$OD_{600\,nm}$=2.0时开始进行诱导，B、D组在$OD_{600\,nm}$=3.0开始诱导，A、B两组为加入78 μL 0.1 mmol/L IPTG＋2.5 g/L乳糖混合诱导，C、D两组为加入95 μL 0.1 mmol/L IPTG＋2.5 g/L乳糖混合诱导4 h。

2 结果与分析

2.1 IPTG和乳糖联合诱导

表1 IPTG和乳糖联合诱导所得右旋糖酐蔗糖酶酶活力

Table 1 Activity of dextransucrase induced by the presence of both IPTG and lactose

诱导时间/h	酶活力/（U/mL）			
	A组	B组	C组	D组
3	24.42	26.83		
4	43.06	40.15	43.96	
5	32.53	34.89		
6	33.78	35.05		12.88
7	22.05	35.20		

由表1可知，比较C、D两组实验可以看出，当乳糖单独作为诱导物的时候，所诱导产生的重组右旋糖酐蔗糖酶酶表达活力较低，乳糖不适合作为独立诱导物来诱导产酶。比较A、B、C、D 4组实验数据可以看出，IPTG与乳糖混合使用作为诱导物能产生较好的效果。比较A、B两组看出，不同的菌浓对酶活力表达并没有特别的影响，但是不能保证在IPTG用量继续较少的情况下，菌浓对其依然没有特别影响，所以在以后的实验中，菌浓需要继续同时考察$OD_{600\,nm}$=2.0以及$OD_{600\,nm}$=3.0两种情况。由于最终目的是节约成本，即降低IPTG用量，在此实验基础之上，继续考察降低IPTG的用量，并同时考察乳糖用量增减对此过程的影响。

2.2 IPTG和乳糖联合诱导条件优化

2.2.1 乳糖添加量对诱导过程的影响

表2 IPTG和乳糖联合诱导所得右旋糖酐蔗糖酶酶活力

Table 2 Activity of dextransucrase induced by the presence of both IPTG and lactose

诱导时间/h	酶活力/（U/mL）					
	A组	B组	C组	D组	E组	F组
3	15.75	15.88	25.37	26.42	5.37	6.42
4	17.60	19.75	29.41	28.44	9.41	10.44
5	13.40	15.40	27.34	26.31	8.34	8.31
6	14.33	11.36	25.26	23.15	8.26	5.15
7	9.30	14.19	23.06	19.16	6.06	5.16

由表2可知，在降低IPTG浓度后，所诱导得到的酶活力很低。主要原因为当IPTG用量过低的时候，不能有效的抑制菌体的生长，无法进行持续的诱导而使得合成的可溶性蛋白减少；当提高加入乳糖的量时，酶活力相对并没有提高；分别比较上述6组可以看出，当IPTG过低时，菌浓对酶活力没有特别的影响；分别比较A、C、E 3组与B、D、F 3组可以看出，乳糖质量浓度提高并不能使得酶活力提高，反而会抑制酶活力，所以在二者混合诱导时，乳糖的量不能过多，本实验结果显示选择乳糖质量浓度为2.5 g/L；将0.1 mmol/L IPTG用量定在60～125 μL，根据预实验情况选择78 μL以及95 μL 2个值来考察。

2.2.2 IPTG用量对诱导过程的影响

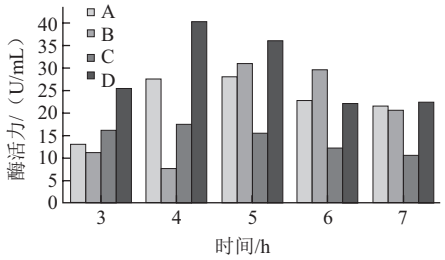


图1 IPTG用量对右旋糖酐蔗糖酶酶活力的影响

Fig.1 Effect of IPTG concentration on dextransucrase activity

由图1可知，比较A、B两组数据，当添加78 μL 0.1 mmol/L IPTG时，所得的酶活力相对较低，最适合条件为$OD_{600\,nm}$=3.0条件下诱导5 h，所得的酶活力为31.10 U/mL，酶活力不是很理想；比较C、D两组数据，当添加95 μL 0.1 mmol/L IPTG时，所得的酶活力最高为在$OD_{600\,nm}$=3.0时IPTG和乳糖联合诱导4 h后右旋糖酐蔗糖酶酶活力达到40.44 U/mL，相对较高。得出最优组合为95 μL 0.1 mmol/L IPTG＋2.5 g/L乳糖。

3 结 论

当乳糖单独使用被用来作为诱导物的时候，其诱导产生的右旋糖酐蔗糖酶活力很低，不能用来作为诱导剂；而使用IPTG作为诱导物的时候，能够得到比较理想的效果。但是IPTG是有毒物质，所以在不得不使用IPTG作为诱导物的情况下，需要尽量减少IPTG的用量。在$OD_{600\,nm}$=3.0、0.1 mmol/L IPTG 95 μL＋2.5 g/L乳糖情况下，混合诱导4 h，酶活力可以达到40.44 U/mL。与单独IPTG诱导相比，IPTG用量减少了62%，而酶活力仅减少了8%。同文献[19-20]比较，IPTG用量减少了5%，而酶活力保持在相当的水平。结果表明IPTG与乳糖混合诱导可行，既可以降低生产的成本，又可以减少IPTG作为有毒物质所带来的不利影响，为工业应用提供参考。

参考文献：

[1] ROBYT J F, EKLUND S H. Revative quantitative effects of acceptors in the reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512F dextransucrase[J]. Carbonhydrate Research, 1983, 121: 279-286.

[2] ROBYT J F, SEUNG-HEON Y, RUPENDRA M. Dextransucrase and the mechanism for dextran biosynthesis[J]. Carbohydrate Research, 2008, 10: 1-10.

[3] RICHARD G, YU S K. A novel family of glucosyl 1,5-anhydro-*D*-fructose derivatives synthesised by transglucosylation with dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F[J]. Carbohydrate Research, 2005, 340: 395-401.

[4] CCRANE R. Intestinal absorption of sugars[J]. Physiology Reviews, 1960, 40: 789.

[5] OLEFSEY J M, CRAPO P. Fructose its characteristics, pH, physiology and metabolism[J]. Food Science, 1978, 43: 251.

[6] 陈洁, 赵郁, 徐玉延, 等. 果糖的研究进展[J]. 华西药学杂志,2002, 15(2): 111-112.

[7] 苑家骏, 李思忠, 李小娜, 等. 果糖在运动中的应用[J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(2): 149-150.

[8] ESTER J T, MICHELE V. Production of high-fructose syrup using immobilized invertase in a membrane reactor[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80: 662-667.

[9] TAUCHIYA H M, KOEPSELL H J, CORMAN J, et al. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Journal of Bacteriology, 1952, 64(4): 521-526.

[10] ALSOP R M. Industrial production of dextrans[J]. Progress in Industrial Microbiology, 1983, 18: 1-44.

[11] VELJKOVIC V B, LAZIC M L, RUTIC D J, et al. Effects of aeration on extracellular dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1992, 14(8): 665-668.

[12] LAZIC M L, VELJKOVIC V B, VUCETIC J I. Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15(4): 334-338.

[13] GREGORY L, COTE J F. Isolation and partial characterization of an extracelular glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes an alternating(16),(13)-*α*-*D*-glucan carbonhydrate research[J]. Carbohydrate Research, 1982, 101: 57-74.

[14] WILKE-DOUGLAS M, PERCHOROWICZ J T, HOUCH C M, et al. Methods and compositions for altering physical characteristics of fruit and fruit products: USA, WO89/12386 [P]. 1989-12-28.

[15] MALTEN M, NAHRSTEDT H, MEINHARDT F, et al. Coexpression of the type I signal peptidase gene *sipM* increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS 941[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 91(5): 616-621.

[16] MALTEN M, HOLLMANN R, DECKWER W D, et al. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(2): 206-218.

[17] 张洪斌, 胡雪芹, 冒小青, 等. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的表达条件优化[J]. 生物工程学报, 2009, 25(12): 2022-2028.

[18] 张洪斌, 朱春宝, 胡又佳, 等. 右旋糖酐蔗糖酶工程菌株的构建及其培养条件的研究[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 1-6.

[19] ZHANG Hongbin, HU Youjia, ZHU Chunbao, et al. Cloning, sequencing and expression of a dextransucrase gene (*dex*YG) from *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Biotechnology Letter, 2008, 30: 1441-1446.

[20] 王雅洁, 张洪斌, 胡雪芹, 等. 重组大肠杆菌右旋糖酐蔗糖酶的纯化及其性质[J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1266-1269.