

## 肠膜明串珠菌右旋糖苷蔗糖酶的研究进展\*

罗 靳 杨雅麟 王建华\*\*

(中国农科院饲料研究所基因工程研究室 北京 100081)

**摘要** 综述了肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)右旋糖苷蔗糖酶结构、作用机制、基因克隆与表达研究进展。

**关键词** 右旋糖苷蔗糖酶, 右旋糖酐, 异源表达, 肠膜明串珠菌

**中图分类号** :Q785 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)04-0787-04

### A Review on the Research Progress and Prospect of the *Leuconostoc mesenteroides* Dextransucrase\*

LUO Jin YANG Ya-Lin WANG Jian-Hua\*\*

(Gene Engineering Laboratory, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

**Abstract** The structure, reaction mechanism and molecular biology of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase are reviewed.

**Key words** Dextransucrase, Dextran, Heterogeneous expression, *Leuconostoc mesenteroides* (Lm)

右旋糖苷蔗糖酶(dextransucrase 简称 DSR, EC 2.4.1.5)是葡聚糖蔗糖酶(glucansucrase, 又称葡萄糖基转移酶, glucosyltransferase 简称 GTF)的一种, 属于糖苷水解酶第 70 家族(Family 70), 是葡聚糖蔗糖酶领域中研究较早较热门的一类酶。其产物右旋糖酐(dextran)是主链含大于 50% 的  $\alpha$  (1-6)糖苷键, 支链含  $\alpha$  (1-3)  $\alpha$  (1-2)或  $\alpha$  (1-4)糖苷键的  $\alpha$ -1, 6-D-葡聚糖, 可溶, 可作为血浆代替品, 在医药、食品、饲料中用途广泛, 而其它葡聚糖蔗糖酶种类(统称 Gtf-I)的催化产物因含有大量  $\alpha$  (1-3)糖苷键而形成不可溶的葡聚糖, 应用受限。链球菌属(*Streptococcus*) 肠膜明串珠菌属(*Leuconostoc mesenteroides*, 简称 Lm) 乳酸菌属和一些烟草植物细胞中可生成右旋糖苷蔗糖酶, 其中肠膜明串珠菌是最常用菌株。国内注重应用研究, 国外在理论研究方面比较深入和成熟。从上世纪 40 年代到 80 年代, 重点研究酶的获得与结构功能分析、产酶原始菌株与催化产物的分离工作。90 年代以来则以基因克隆、改造和异源表达为主。本文综述了该酶结构与功能、作用机制和基因工程等方面研究现状。

## 1 结构特征

迄今关于右旋糖苷蔗糖酶结构和功能研究很多, 其共性结构特征(图 1)包括: N-端催化域(catalytic domain, CD)能形成( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> 管状结构域(图 2), 具有催化水解蔗糖的功能; C-端葡萄糖结合域(glucan binding domain, GBD)由几个重复单元组成(不同的酶, 重复单元的个数不同), 具有转移酶活性, 它将切割下来的葡萄糖残基转移到葡聚糖上并催化产物右旋糖酐或寡糖脱离催化位点。

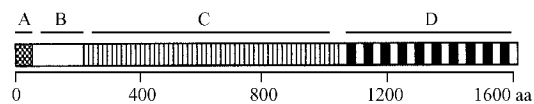


图 1 已克隆基因所编码葡聚糖蔗糖酶一级结构示意图

A 信号肽, B 可变域, C N-端催化域, D C-端葡聚糖结合域<sup>[1]</sup>

## 2 作用机制

右旋糖酐生成的两步化学机制是指同时具有蔗糖酶和转移酶两种活性的右旋糖苷蔗糖酶催化两个连续的反应: 先将蔗糖分解成为一个果糖和一

\* 国家 863 计划部分资助( No. 2004AA246040 ) 中国农业科学院饲料研究所所长基金( No. 2004-2005 )

\*\* 通讯作者 Tel 010-62145735, E-mail: wangjianhua@mail.caas.net.cn

收稿日期 2006-11-17, 修回日期 2007-01-04

个与酶连接的葡萄糖基,随后将后者转移到葡聚糖残基的 C3/C6 位置或水分子,形成糖链或简单的水解蔗糖(Robyet, 1974)<sup>[1]</sup>。1986 年 Kobayashi 和 Matsuda 提出了右旋糖苷蔗糖酶与右旋糖酐分子间作用机制:酶在与底物作用形成产物过程中会以聚合体形式存在,酶聚合体由右旋糖酐或右旋糖酐与酶结合的部分和酶-右旋糖酐复合体的电荷异构体构成<sup>[3]</sup>。结合到酶分子上的右旋糖酐既可以作为蔗糖内生引物,继续生成右旋糖酐,又是酶分子的稳定因子。这个理论很好地解释了酶与产物、产物与底物之间为何相互混合难以分离的原因。

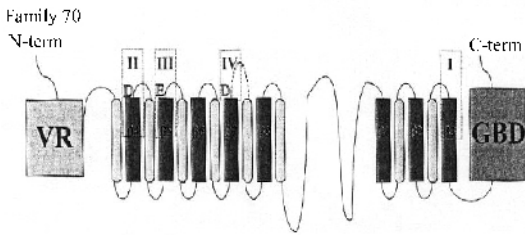


图2 第70家族的葡聚糖蔗糖酶二级结构图

VR 可变区, GBD 葡聚糖结合域<sup>[2]</sup>

葡聚糖结合域的 Arg 可平衡蔗糖中与果糖相连的 C-O 键的电荷,果糖脱离后,又催化葡萄糖残基与水或葡聚糖受体结合<sup>[4]</sup>。另据报道<sup>[5]</sup>将 Asp 511、Asp 513、Asp 551 和 His 661 分别突变,Asp 511 和 Asp 551 突变体几乎完全失去合成右旋糖酐的活性。Chia 等<sup>[6]</sup>点突变保守区 Asp 411 或 Asp 413 使酶活降低 80%,点突变 Asp 437 或 Asp 439 使酶活力完全丧失,而替换两个 Asp 中间的 Val 却使酶活力增加。上述工作表明 Arg、Asp 对酶的活性具有根本性的影响,这也是做基因改造要特别注意之处。

### 3 异源表达的研究

肠膜明串珠菌右旋糖苷蔗糖酶是一种诱导酶,蔗糖既是酶诱导物,又是酶作用底物,右旋糖酐是粘稠性链状分子,它与酶和细胞形成很难分离的复合物,这使得获得右旋糖酐的过程复杂且成本高。作者分析认为通过分子改造和异源表达,再结合固定化酶技术,或许可简化过程回避干扰。但依然有酶分子偏大带来的克隆、改造及表达等困难。以下有关最新研究进展的介绍将有助于找到解决方案。

#### 3.1 微生物基因工程

1989 年 Wilke-Douglase 等首次从 *Lm* NRRL B-

512F 克隆到右旋糖苷蔗糖酶基因 *dsrS*<sup>[7]</sup>。由表 1 知 (1) 已从大量产右旋糖苷蔗糖酶天然菌及其突变株中克隆到相应编码基因 (2) 这些基因较大约 4kb ~ 5kb, 同源性高, 编码 160kD ~ 200kD 蛋白 (3) 天然酶性质稳定, 催化产物可溶性强; 重组酶催化产物可溶性下降明显, 有的甚至改变了性质。总之, 右旋糖苷蔗糖酶基因工程研究还处于初级阶段, 不少问题有待明确。

Robyet 等 (2003) 从 *Lm* NRRL B-742 突变株钓出右旋糖苷蔗糖酶基因 *dsrB742*, 在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中表达的重组酶是分泌表达的组成型酶, 活性提高了 2.6 倍, 这可能与其中 11 个碱基的变异及 N-端 30 个 AA 序列的缺失有关<sup>[15]</sup>。Funane 等 (2004) 参照 DsrS 改变了 DsrT5 的 3 个 AA 序列: Tyr 307 - Asn 477, Lys 668 - Gly 740, Asn 904 - Lys 1118 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达酶的催化产物可溶性比例有所增加, 但仍没超过出发菌株<sup>[8]</sup>, 之后通过增加重组蛋白 Lys 含量 (Thr 350、Ser 455 突变成 Lys), 突变株 T350K/S455K 的葡聚糖转移酶活性增加了 10 倍<sup>[16]</sup>。这些信息可供进一步研究该酶结构与功能关系、构建高效表达菌株等工作参考。

随着转基因技术的发展, 该酶工程菌构建和重组表达研究也进展较快。本课题组在 2004 至 2006 年从一种肠膜明串珠菌中克隆到右旋糖苷蔗糖酶的基因 *dsrX*<sup>[18]</sup>, 现已在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功表达, 是该酶在国内的第一例工作, 重组酶活达 4U/mL, 详细结果另文报道。国外研究 *dsrS* 基因在 *E. coli* 胞内表达 (2006) 和巨大芽孢杆菌 (2004) 分泌表达的酶活水平分别达 5.85U/mL<sup>[19]</sup> 和 0.065U/mL<sup>[20]</sup>, 前者是同类研究报道的最高值, 后者经高密度培养酶活达 28.6U/mL, 是迄今该酶重组分泌表达的最高值。但大部分酶活来自于胞壁结合酶, 实用价值不高, 原因在于信号肽未及时切除导致重组蛋白堆积在细胞壁周围。2005 年通过共表达信号肽酶 *sipM* 基因有效切除了重组右旋糖苷蔗糖酶前体的信号肽, 酶得以分泌到胞外并正确折叠形成成熟酶, 使发酵液重组酶表达量提高了 3.5 倍<sup>[21]</sup>。虽然此重组酶的活性未达到预期水平, 但分泌表达无疑是实现该酶生产的重要方向。

#### 3.2 植物基因工程

2005 年 Kok-Jacobs 等将肠膜明串珠菌的 *dsrS* 基

因转入马铃薯 ,表达的右旋糖苷蔗糖酶与马铃薯块茎淀粉粒直接作用生成右旋糖酐 ,并在块茎汁中检测到该产物<sup>[21]</sup>。这是右旋糖苷蔗糖酶基因转入高等植物表达的第一例工作 ,具有重要意义。但如何纯化右旋糖酐还需进一步研究。

表 1 来源于 *Lm* 菌的右旋糖苷蔗糖酶基因及其表达

| 来源菌株                     | 基因                            | 表达菌株                              | 基因特征  | 天然酶特性   | 重组酶特性   |
|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|---|---|
| <i>Lm</i> NRRL B-512F    | <i>dsrS</i> <sup>[7]</sup>    | <i>E. coli</i> DH1 ,              | 4946bp  | 170kD 催化产物含 5% $\alpha$ (1-3 )和 95% $\alpha$ (1-6 )糖苷键              | 170kD 催化产物含有多种不同种类糖苷键 <sup>[8]</sup>  |
|                          | <i>dsrT</i> <sup>[9]</sup>    | <i>E. coli</i> BL21( DE3 )        | <i>dsrS</i> 截短突变 , 3148bp ,1015aa   |   | 112kD ,但不具有酶活性  |
|                          | <i>dsrTS</i> <sup>[9]</sup>   |                                   | 由 <i>dsrT</i> 构建 3153bp   |   | 112kD 催化产物 90% 不可溶 ,含多种不同种类糖苷键  |
| <i>Lm</i> NRRL B-1299    | <i>dsrA</i> <sup>[7]</sup>    | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$       | 4870bp , 1299aa   | 146kD 缺乏信号肽序列 ,催化产物含 85% $\alpha$ (1-6 )糖苷键和 15% $\alpha$ (1-3 )糖苷键 | 146kD 缺乏信号肽序列 ,催化产物含 85% $\alpha$ (1-6 )糖苷键和 15% $\alpha$ (1-3 )糖苷键 ,但产物不可溶 |
|                          | <i>dsrB</i> <sup>[10]</sup>   | <i>E. coli</i> DH1                | 4521bp ,1507aa 基因序列与 <i>dsrS</i> 相似 ,                                       | 168kD 催化产物含 $\alpha$ (1-6 )和 $\alpha$ (1-2 )糖苷键                     | 168kD 重组酶催化产物只检测到 $\alpha$ (1-6 )糖苷键 ,未检测到 $\alpha$ (1-2 )糖苷键               |
|                          | <i>dsrE</i> <sup>[11]</sup>   | <i>E. coli</i> TOP10              | 8508bp ,2835aa , 与 <i>dsrS</i> 35% 同源 , 与 <i>dsrB</i> 36% 同源                | 313kD 催化生成大量 $\alpha$ (1-2 )糖苷键                                     | 313kD 含两个活性催化域 CD1 和 CD2 , 中间为 GBD ,催化生成多种糖苷键                               |
| <i>Lm</i> NRRL B-512FMC  | <i>mlfT</i> <sup>[12]</sup>   | <i>E. coli</i> BL21 ( DE3 ) plysS | 1272bp ,424aa   | 47.1kD  | DsrFMC 是具有形成果聚糖功能的果聚糖蔗糖酶  |
| <i>Lm</i> NRRL B-512FMCM | <i>fmcmds</i> <sup>[13]</sup> | <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$       | 4699bp ,1527aa , 与 <i>dsrB</i> 63% 同源                                       | 170kD 催化产物含 5% $\alpha$ (1-3 )和 95% $\alpha$ (1-6 )糖苷键              | 170kD 催化产物含大量 $\alpha$ (1-6 )糖苷键和 $\alpha$ (1-3 )糖苷键支链                      |
| <i>Lm</i> Lcc4           | <i>dsrD</i> <sup>[14]</sup>   | <i>Lactococcus lactis</i> MG1363  | 4.6kb ,1527aa ,与 <i>dsrS</i> , <i>dsrB</i> , <i>dsrA</i> 分别同源 98% ,67% ,50% | 性质与 DsrS 相似   | 165kD 酶活最高 5U/mL  |

4 结语

右旋糖苷蔗糖酶发现和研究较早 ,由于该酶的特性及其对底物和产物的依赖性 ,研究进展不太令人满意 :该酶的起源与分子进化线路不明 结构与功能关系缺乏足够了解 ,三级结构也不清楚 转基因右旋糖苷蔗糖酶表达水平普遍不高。具体而言采用基因工程手段异源表达目的蛋白遇到了两大问题 (1) 重组酶催化生成的葡聚糖可溶性下降 ,即  $\alpha$  (1-6 )糖苷键含量降低 (2) 酶分子的稳定性问题。原始菌株中 ,酶分子与其产物右旋糖酐结合 ,不但固定了酶分子 ,而且给酶分子提供了一个反应平台 ,有助于酶与底物蔗糖进一步反应 ,从而增加了酶的稳定性 ,而转基因菌株中因为没有这个平台 ,使得生产出来的酶分子大量堆积。这是基于理论和应用目的的右旋糖苷蔗糖酶转基因表达研究急需解决的问题。结合几年工作经验我们认为以下办法是值得尝试的 (1) 采

用或构建与天然菌株性质相似的分泌表达系统 ,以确保重组酶与天然酶的同质性 ,并获得结构功能稳定的酶催化产物 (2) 随着该酶的结构与功能关系研究的深入和积累 ,围绕目标功能进行分子设计 ,并通过 (a) 优化活性区域 AA 序列 ,提高重组酶活性及稳定性 (b) 截短表达或删除与目标功能无关的 AA 序列以减少目标蛋白错误折叠频率 ,同时减少表达负担和提高酶的比活。总之 ,目前国内相关研究处于起步阶段 ,与国际先进水平存在较大差距 这也说明在国内此研究领域有较大的发展空间和潜力。

参考文献

[ 1 ] Monchois V , Willemot R M , Monsan P. FEMS Microbiol Rev , 1999 , 23( 2 ) :131 ~ 151.  
[ 2 ] Sacha A F T van Hijum , Slavko kralj , Lukasz K Ozirek , et al. Microbiol Mol Biol Rev , 2006 , 70( 1 ) :157 ~ 176.

- [ 4 ] Mooser G , Hefta S A , Paxton R J , *et al.* J Biol Chem , 1991 , **266** ( 14 ) : 8916 ~ 8922.
- [ 5 ] Monchois V , Remaud-Simeon M , Russell R R , *et al.* Appl Microbiol Biotechnol , 1997 , **48**( 4 ) : 465 ~ 472.
- [ 6 ] Chia J S , Yang C S , Chen J Y . Infect Immun , 1998 , **66**( 10 ) : 4797 ~ 4783.
- [ 7 ] Monchois V , Willemot R M , Remaud-Simeon M , *et al.* Gene , 1996 , **182**( 1-2 ) : 23 ~ 32.
- [ 8 ] Funane K , Ishii T , Terasawa K . Biosci Biotechnol Biochem , 2004 , **68** ( 9 ) : 1912 ~ 1920.
- [ 9 ] Funane K , Ishii T , Matsushita M , *et al.* Carbohydr Res , 2001 , **334** ( 1 ) : 19 ~ 25.
- [ 10 ] Monchois V , Remaud-Simeon M , Monsan P , *et al.* FEMS Microbiol Lett , 1998 , **159**( 2 ) : 307 ~ 315.
- [ 11 ] Fabre E , Bozonnet S , Arcache A , *et al.* J Bacteriol , 2005 , **187**( 1 ) : 296 ~ 303.
- [ 12 ] Kang H K , Seo M Y , Seo E S , *et al.* Biochim Biophys Acta , 2005 , **1727**( 1 ) : 5 ~ 15.
- [ 13 ] Ryu H J , Kim D , Kim D W , *et al.* Biotechnol Lett , 2000 , **22** : 421 ~ 425.
- [ 14 ] Neubauer H , Bauche A , Mollet B . Microbiology , 2003 , **149**( 4 ) : 973 ~ 982.
- [ 15 ] Kang H K , Seo E S , Robyt J F , *et al.* J Mol Catal B : Enzym , 2003 , **26** : 167 ~ 176.
- [ 16 ] Funane K , Ishii T , Ono H . FEBS Lett , 2005 , **579**( 21 ) : 4739 ~ 4745.
- [ 17 ] 邵彦春 , 王建华 , 滕 达 , 等 . 微生物学通报 , 2005 , **32**( 3 ) : 20 ~ 23.
- [ 18 ] Moulis C , Arcache A , Escalier P C , *et al.* FEMS Microbiol Lett , 2006 , **261**( 2 ) : 203 ~ 210.
- [ 19 ] Malten M , Hollmann R , Deckwer W D , *et al.* Biotechnol Bioeng , 2005 , **89**( 2 ) : 206 ~ 218.
- [ 20 ] Malten M , Nahrstedt H , Meinhardt F , *et al.* Biotechnol Bioeng , 2005 , **91**( 5 ) : 616 ~ 621.
- [ 21 ] Kok-Jacon G A , Vincken J P , Suurs L C , *et al.* Transgenic Res , 2005 , **14**( 4 ) : 385 ~ 395.