

体外多酶级联催化合成 GDP-L-岩藻糖

凌贺, 梁书利, 林影*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 511400)

摘要: GDP-L-岩藻糖(二磷酸鸟苷-L-岩藻糖)是一种重要的核苷酸糖,是岩藻糖基化修饰的重要糖基供体。为建立一种合成 GDP-L-岩藻糖的新方法,该研究设计了一条从淀粉到 GDP-L-岩藻糖的生物合成途径,合成途径由 8 个酶级联催化,对这 8 个途径酶进行筛选并在大肠杆菌中表达及纯化。在此基础上,构建体外多酶级联体系合成 GDP-L-岩藻糖,并对构建的合成体系进行反应条件的优化以提高 GDP-L-岩藻糖的合成效率。所筛选得到的 8 个途径酶均为嗜热菌来源,分别为:糖原磷酸化酶 α GP、磷酸葡萄糖变位酶 PGM、磷酸葡萄糖异构酶 PGI、磷酸果糖异构酶 ManA、磷酸甘露糖变位酶 ManB、GDP-甘露糖焦磷酸化酶 ManC、GDP-甘露糖 4,6-脱水酶 Gmd、GDP-L-岩藻糖合成酶 WcaG。对多酶催化合成体系的反应温度、pH 值、酶配比、 Mg^{2+} 浓度、NADPH 浓度、磷酸盐缓冲液浓度进行优化,最终以 1 g/L 淀粉为底物,一锅法反应 5 h, GDP-L-岩藻糖产率达到 53.23%,产量为 0.53 g/L。该研究首次在体外实现淀粉到 GDP-L-岩藻糖的生物合成,为淀粉基可再生资源体外合成 GDP-L 岩藻糖提供了一条新方法。

关键词: 体外多酶级联; GDP-L-岩藻糖; 大肠杆菌

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.11.1253

Synthesis of GDP-L-fucose by Multi-enzyme Cascade Catalysis *in Vitro*

LING He, LIANG Shuli, LIN Ying*

(School of Biology and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 511400, China)

Abstract: GDP-L-fucose is recognized as an important nucleotide sugar and a critical glycosyl donor in fucosylation modification. In order to build a new method to synthesize GDP-L-fucose, in this study, a biosynthetic pathway from starch to GDP-L-fucose was designed. The pathway is catalyzed by eight enzymes. After these eight enzymes were screened and identified, they were expressed in *Escherichia coli* and subsequently purified. Based on this, a multi-enzyme cascade system was constructed *in vitro* to synthesize GDP-L-fucose, and the reaction conditions were optimized to enhance the synthesis. The eight enzymes, all derived from thermophilic bacteria, include α -glucan phosphorylase (α GP), phosphoglucosamine mutase (PGM), glucose-6-phosphate isomerase (PGI), class I mannose-6-phosphate isomerase (ManA), phosphomannomutase (ManB), mannose-1-phosphate guanylyltransferase (ManC), GDP-mannose 4,6-dehydratase (Gmd), and GDP-L-fucose synthetase (WcaG). After the reaction temperature, pH, enzyme ratio, Mg^{2+} concentration, NADPH concentration and phosphate buffer concentration were optimized, the reaction was conducted with 1 g/L starch in one pot, resulting in a GDP-L-fucose yield of 53.23% and 0.53 g/L. This study is the first study to achieve the biosynthesis of GDP-L-fucose from starch *in vitro*, providing a new method for the synthesis of GDP-L-fucose from starch-based renewable resources *in vitro*.

Keywords: multi-enzyme cascade *in vitro*; GDP-L-fucose; *Escherichia coli*

GDP-L-岩藻糖(二磷酸鸟苷-L-岩藻糖)是一种重要的核苷酸糖,是岩藻糖基化修饰的重要糖基供体,其可与寡糖、糖蛋白和糖脂等结合,形成岩藻糖基化碳水化合物,具有重要的生理作用^[1,2]。其中,GDP-L-岩藻糖作为岩藻糖基乳糖的直接糖基供体,在岩藻糖基乳糖合成中发挥至关重要的作用。岩藻糖基乳糖具有改善肠道微生物菌群、抑制病原体粘附、调节免疫反应和促进大脑发育等功能,在医药、保健品、化妆品、食品等行业具有巨大的应用前景^[3-5]。

GDP-L-岩藻糖的合成方法主要有化学法、发酵法和多酶催化法^[6]。目前,工业上合成 GDP-L-岩藻糖主要采

收稿日期: 2024-08-24; 修回日期: 2024-12-06; 接受日期: 2024-12-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFA0901700)

作者简介: 凌贺(1997-),男,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: 202120149324@mail.scut.edu.cn; 共同第一作者: 梁书利(1985-),男,博士,教授,研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: shuli@scut.edu.cn

通讯作者: 林影(1962-),女,博士,教授,研究方向:生物化学与分子生物学,E-mail: feylin@scut.edu.cn

用的方法是化学合成法。化学合成法生产工艺复杂、环境污染严重、费时、产率低、产品的安全性难以保证且存在一定的操作安全问题^[4]。所以,当前研究方向更多的转向绿色可持续的生物合成法,生物合成法中按照合成工艺的不同又分为发酵法和多酶催化法^[7,8]。

相比于发酵法,多酶催化法在底物转化率、产量、生产效率、产物纯化以及反应调控上均具有明显的优势^[9-11],具体如下:(1)不同于发酵法存在复杂的副反应,多酶催化法副反应较少,底物能够更多地流向产物生成,实现更高的转化率和产率;(2)多酶催化法能自由灵活地调整酶的用量和底物反应浓度,从而实现更高的产物生成^[12];(3)酶催化反应的高效性决定了多酶催化法具有生产效率上的优势,合成周期相较于发酵法明显缩短;(4)副产物较少,目标产物的分离纯化更加简便;(5)反应调控更有针对性、更加直接、调控效果更好。多酶催化法的这些优势预示着其在工业化生产 GDP-L-岩藻糖中具有巨大潜力^[13-15]。

目前多酶催化法合成 GDP-L-岩藻糖所面临的问题主要有以下几点^[16-18]:(1)底物较昂贵,如 L-岩藻糖和 GDP-D-甘露糖;(2)反应涉及到多种辅因子如 ATP 和 NADPH 的添加,这些辅因子价格昂贵且稳定性较差,相应的合成体系中缺少辅因子的平衡和再生;(3)酶的热稳定性差,目前多酶催化法合成 GDP-L-岩藻糖所用的酶均为大肠杆菌来源,其热稳定性差,反应温度通常为 37 °C 或 35 °C,反应时间较长而产量较低^[19,20],如 Mahour R^[4]以岩藻糖为底物,经七步纯酶催化反应,实现 GDP-L-岩藻糖的合成,37 °C 反应 48 h 产量达 4.1 g/L。本研究围绕以上问题,设计了一条从淀粉到 GDP-L-岩藻糖的生物合成途径,在此基础上,构建体外多酶级联体系成功合成 GDP-L-岩藻糖,并对构建的合成体系进行反应条件的初步优化以提高 GDP-L-岩藻糖的产率。本研究首次在体外实现淀粉到 GDP-L-岩藻糖的生物合成,为淀粉基可再生资源合成 GDP-L 岩藻糖提供了一条新方法,同时,嗜热菌来源酶的应用也为体外合成 GDP-L-岩藻糖缩短反应时间提供了一定的借鉴意见。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 菌株和质粒

克隆菌株 E.coli Top 10、表达菌株 E.coli BL21 (DE3)、表达载体 pET28a (+) 均为本实验室保存。质粒 pET28a- α GP-LG、pET28a-PGM-LG、pET28a-PGI-LG、pET28a-ManA、pET28a-ManB、pET28a-ManC、pET28a-Gmd、pET28a-WcaG 分别带有经大肠杆菌密码子优化后的基因 α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG,这些基因由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.1.2 工具酶和试剂

限制性内切酶 NcoI、BamHI、XhoI、NdeI,购自 Thermo 公司,KOD 高保真聚合酶,购自日本东洋纺公司。质粒小量提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化回收试剂盒,均购自广州 Magen 公司。酵母提取物 Yeast Extract、胰蛋白胨 Tryptone,购自英国 Oxoid 公司。可溶性淀粉、GDP-L-岩藻糖、GTP、NADPH,购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

5341 基因扩增仪,德国 Eppendorf 公司;ESP 300 核酸电泳仪,上海天能公司;SW-CJ-1F 超净工作台,苏州安泰公司;Centrifuge 5840R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;AKTA pure 蛋白层析仪,General Electric 公司;Varioskan LUX 多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;ThermoMixer 恒温混匀仪,德国 Eppendorf 公司;2489 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 途径酶表达载体的构建

在完成对途径酶的筛选和挖掘后,委托上海捷瑞生物工程有限公司对各途径酶编码基因进行大肠杆菌密码子优化后进行全基因合成。在所合基因两端均引入酶切位点 NdeI 和 BamHI,将基因合在模式载体 pET28a (+) 上。以含编码途径酶基因的质粒为模板进行 PCR 扩增,经核酸凝胶电泳进行分离,并利用凝胶 DNA 小量回收试剂盒进行纯化回收以获得编码各个途径酶的基因片段。以实验室保有的带有 6 His 标签的质粒 pET28a-MrNampt 为模

板, 利用限制性内切酶 NdeI 和 BamHI 对质粒进行双酶切, 经核酸凝胶电泳进行分离, 并利用凝胶 DNA 小量回收试剂盒对酶切下的载体片段进行纯化回收以获得带有 6 His 标签的线性表达载体。通过同源重组方式利用同源重组酶对基因片段和线性表达载体进行重组, 重组产物转化进 E coli TOP10 感受态细胞, 经菌落 PCR 鉴定获得各个途径酶的表达质粒。

1.2.2 途径酶的表达和纯化

将构建好的表达质粒转化进 E coli BL21 (DE3) 感受态细胞中, 获得各个途径酶的表达菌株。将构建好的表达菌株接种于 10 mL LB 培养基 (50 mL 锥形瓶中), 37 °C、220 r/min 恒温摇床培养 12 h, 然后控制起始 OD₆₀₀ 在 0.1 转接到 100 mL LB 培养基中 (500 mL 锥形瓶), 37 °C、220 r/min 恒温摇床培养, 待 OD₆₀₀ 到 0.6~0.8, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 16 °C、180 r/min 诱导表达 16 h。

诱导表达结束后收菌, 利用超声破碎仪对菌体进行破碎, 功率选 35%, 破 3 s 间歇 3 s 破 30 min。对破碎完的菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 30 min 获得上清中的可溶性蛋白, 利用层析法对可溶性蛋白进行纯化, 通过目的蛋白上的 6 His 标签与层析柱上的镍离子特异性结合实现目的蛋白与杂蛋白的分离。通过调整洗脱缓冲液中的咪唑浓度可以实现对不同酶蛋白的分离纯化。

1.2.3 体外多酶法合成 GDP-L-岩藻糖

以淀粉为底物合成 GDP-L-岩藻糖的反应在含 200 μ L 反应体系的 2 mL 离心管中进行, 控制体系中各反应物质的浓度为: 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, 10 g/L 的淀粉, 1 mmol/L 的 GTP, 1 mmol/L 的 NADPH, 10 mmol/L 的 NaH₂PO₄, 5 mmol/L 的 MgCl₂, 各途径酶的质量浓度均为 0.1 g/L。在 50 °C、800 r/min 条件下反应 2 h。通过煮沸 5 min 终止反应, 反应物过 0.2 μ m 滤膜进行 HPLC 分析。

1.2.4 多酶催化体系反应条件的优化

反应在含 200 μ L 反应体系的 2 mL 离心管中进行, 通过单因素优化实验对反应温度、pH、酶配比、Mg²⁺浓度、NADPH 浓度、磷酸盐缓冲液浓度、GTP 浓度、淀粉质量浓度进行优化探究。

1.2.4.1 反应温度优化

反应体系为: 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0), 10 g/L 的淀粉, 1 mmol/L 的 GTP, 1 mmol/L 的 NADPH, 10 mmol/L 的 NaH₂PO₄, 5 mmol/L 的 MgCl₂, 途径酶的质量浓度均为 0.1 g/L。在不同温度下, 800 r/min 反应 2 h 来探究不同温度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。设置的温度梯度为: 30、40、50、55、60、65、70、80 °C。

1.2.4.2 pH 值的优化

本节实验使用到 Tris-HCl 和磷酸盐两种缓冲液, 两者可有效缓冲的 pH 范围不同, Tris-HCl 缓冲液的有限缓冲范围通常在 pH 值 7.0~9.0, 偏碱性, 磷酸盐缓冲液的有限缓冲范围较广, 通常在 pH 4.0~8.0, 偏酸性。

反应体系为: 不同 pH 值的 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液和磷酸盐缓冲液, 10 g/L 的淀粉, 1 mmol/L 的 GTP, 1 mmol/L 的 NADPH, 10 mmol/L 的 NaH₂PO₄, 5 mmol/L 的 MgCl₂, 途径酶的质量浓度均为 0.1 g/L。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究 pH 值对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。设置的 pH 值梯度为: 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。

1.2.4.3 酶配比的优化

本研究中, 首先需要完成一个八因素三水平的实验以探究 8 个途径酶对 GDP-L-岩藻糖合成的不同影响。通过正交实验设计了一个 L₂₇ (3⁸) 的正交表去完成实验, 对实验结果进行多因素方差分析和极差分析, 得出各个途径酶对 GDP-L-岩藻糖合成影响的相对大小, 据此得出影响 GDP-L-岩藻糖合成的关键酶和限制酶, 再通过单一因素实验具体探究这些酶的质量浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响, 并对所有途径酶的最佳酶配比进行预测组合最终得出最佳酶配比。

1.2.4.4 Mg²⁺浓度优化

反应体系为: 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 5.00), 10 g/L 的淀粉, 1 mmol/L 的 GTP, 1 mmol/L 的 NADPH, α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L, 不同浓度的 MgCl₂。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究 Mg²⁺浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。实验设置的 Mg²⁺浓度梯度为: 0.5、1、2、3、5、10、20 mmol/L。

1.2.4.5 NADPH 浓度优化

反应体系为: 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 5.0), 10 g/L 的淀粉, 1 mmol/L 的 GTP, 2 mmol/L 的 MgCl₂,

α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L，不同浓度的 NADPH。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究 NADPH 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。实验设置的 NADPH 浓度梯度为：0.5、1、2、3、4、5 mmol/L。

1.2.4.6 磷酸盐缓冲液浓度优化

反应体系为：不同浓度的磷酸盐缓冲液（pH 5.0），10 g/L 的淀粉，1 mmol/L 的 GTP，3 mmol/L 的 NADPH，2 mmol/L 的 MgCl_2 ， α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究磷酸盐缓冲液浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。实验设置的磷酸盐缓冲液浓度梯度为：5、10、20、40、50、60、80、100 mmol/L。

1.2.4.7 GTP 反应浓度优化

反应体系为：20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液（pH 5.0），10 g/L 的淀粉，3 mmol/L 的 NADPH，2 mmol/L 的 MgCl_2 ， α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L，不同浓度的 GTP。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究 GTP 反应浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。实验设置的 GTP 浓度梯度为：0.5、1、2、3、4、5、6、10 mmol/L。

1.2.4.8 淀粉反应浓度优化

反应体系为：20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液（pH 5.0），3 mmol/L 的 NADPH，3 mmol/L 的 GTP，2 mmol/L 的 MgCl_2 ， α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L，不同浓度的淀粉。在 55 °C、800 r/min 反应 2 h 来探究淀粉反应浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。实验设置的淀粉质量浓度梯度为：0.1、0.3、0.5、1、2、3、5 g/L。

1.2.5 HPLC 分析

使用的高效液相分析系统为 Waters 2690-2489 HPLC 系统，使用的分析柱子为 shim-pack GIST C18-AQ(5 μm , 250 mm $\times$ 4.6 mm)，检测器为 UV 检测器，检测波长为 254 nm，柱温控制在 40 °C。流动相为：A 液：20 mmol/L 的醋酸三乙胺，用冰醋酸调 pH 为 6.0，使用前经 0.2 μm 的水系滤膜过滤并超声脱气 20 min。B 液：纯乙腈，使用前经 0.2 μm 的有机系滤膜过滤并超声脱气 20 min。分析程序为：总流速为 0.5 mL/min，以 98% 的 A 液和 2% 的 B 液（体积分数）洗脱分析 28 min。反应样经 0.2 μm 滤膜过滤进样分析，GDP-L-岩藻糖标品经同样处理进样分析。对标品浓度和对应的响应峰面积进行线性拟合绘制 GDP-L-岩藻糖标准曲线，将反应样的响应峰面积代入标准曲线对反应样中的目标产物浓度进行定量。

1.2.6 数据统计分析

每组反应设置三个平行，数据值取三个平行的平均值，用误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 体外多酶级联催化合成 GDP-L-岩藻糖体系的构建

2.1.1 GDP-L-岩藻糖多酶级联催化合成途径的设计

使用 PathComp (<https://www.genome.jp/tools/pathcomp/>) 对反应途径进行预测。通过输入起始反应底物淀粉，最终目标产物 GDP-L-岩藻糖，设置不同的反应长度，计算得出可能的反应途径^[21]。依据途径设计的原则，同时参考相关研究对预测的合成途径进行筛选，最终设计出图 1 的合成途径。

在确定反应途径后，利用 eQuilibrator (<https://equilibrator.weizmann.ac.il/>) 对所选的反应途径进行热力学分析，其结果如图 2 所示。反应途径的标准吉布斯自由能变化 ΔG^0 为 -76.4 kJ/mol，说明该途径能够自发反应，有较强的热力学驱动，在热力学上可行。

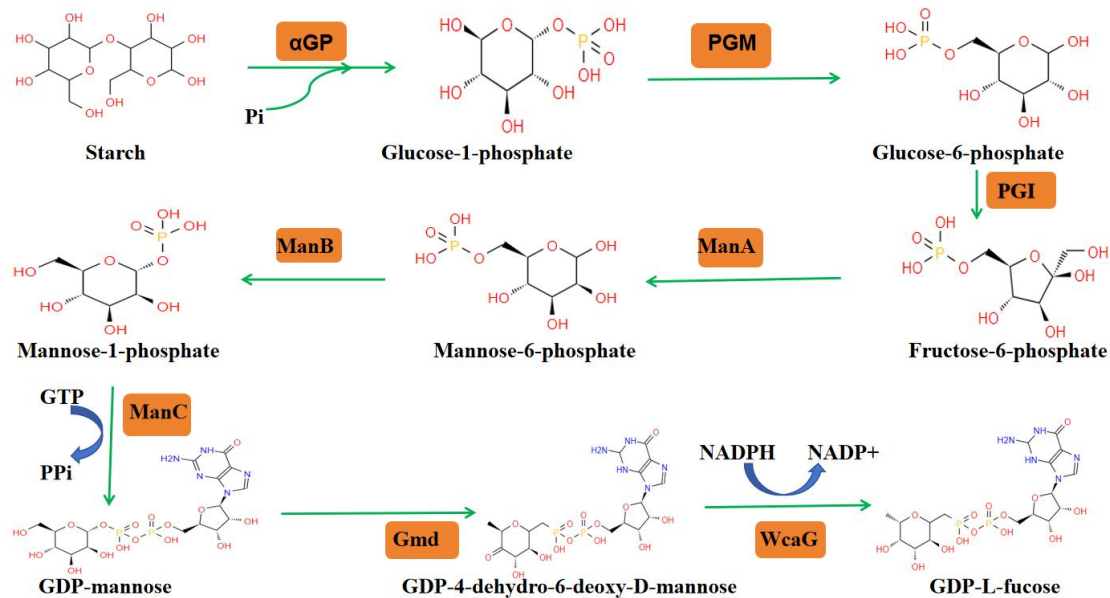


图 1 淀粉为底物多酶级联催化合成 GDP-L-岩藻糖的反应途径

Fig.1 GDP-L-fucose production from starch via a multi-enzymatic biosystem

注：途径经八步酶级联催化反应，依次由酶αGP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 催化。

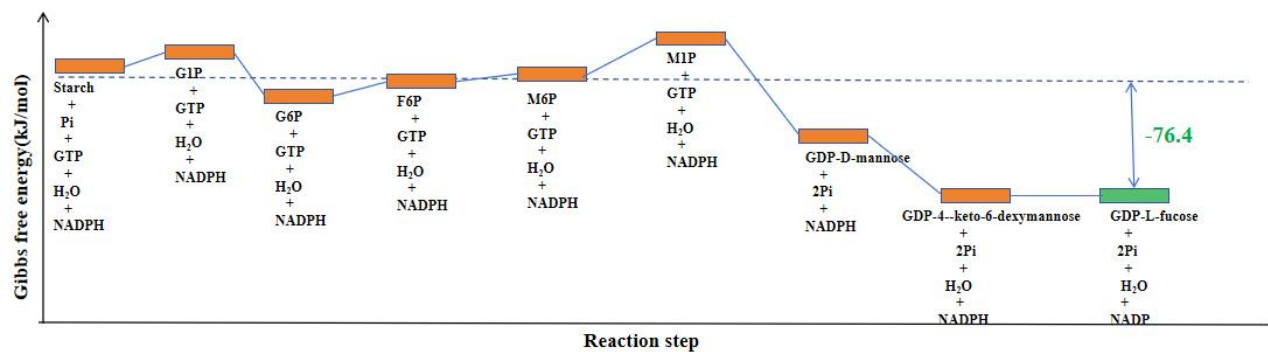


图 2 反应途径的热力学分析

Fig.2 The thermodynamic analysis of the pathway

2.1.2 合成途径酶的筛选与表达

2.1.2.1 酶的筛选

本研究为获得热稳定性良好的酶，优先筛选和挖掘嗜热菌来源的酶，通过文献调研和从数据库中筛选和挖掘，最终选定了以下的途径酶，所有途径酶的基本信息见表 1。其中，αGP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC 已有相关表征和应用，Gmd、WcaG 为本研究新挖掘的功能酶，以大肠杆菌来源的这两个酶对应的碱基序列为探针，利用 NCBI 对这两个酶所有来源的同工酶进行序列比对，设置其物种来源为嗜热菌，同源相似性范围为 40%~75%，利用 NCBI 数据库自建的系统进化树对这两个酶进行随机筛选，最终选择了均来源于嗜热焦里氏菌 *Jhaorihella thermophila* 的 Gmd 和 WcaG。

表 1 途径酶的基本信息

Table 1 The information of the enzymes

途径酶	酶的名称	最适反应温度/℃	物种来源	参考文献
αGP	alpha-glucan phosphorylase	70	<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	[22]
PGM	phosphoglucosamine mutase	70	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	[19]

PGI	Glucose,6-phosphate isomerase	70	<i>Thermus thermophilus</i> HB27	[23]
ManA	ClassImannose-6-phosphateisomerase	80	<i>Thermus thermophilus</i>	[24]
ManB	phosphomannomutase	70	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	[25]
ManC	mannose-1-phosphateguanylyltransferase	80	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	[26]
Gmd	GDP-mannose 4,6-dehydratase	-	<i>Jhaorihella thermophila</i>	-
WcaG	GDP-L-fucose synthase	-	<i>Jhaorihella thermophila</i>	-

2.1.2.2 酶的表达和纯化

从转化平板上挑取阳性转化子接种进行摇瓶发酵表达。所有途径酶均在 16 ℃、180 r/min、0.2 mmol/L IPTG 诱导条件下诱导表达 16 h。通过调整洗脱缓冲液 buffer B 的梯度实现对每个途径酶的有效纯化，其表达纯化结果如下：

α GP、PGM、PGI、ManA 的蛋白分子量大小分别为 101.1、54.7、51、30.3 kDa，如图 3 所示： α GP、PGM、PGI、ManA 均得到可溶性过表达，四种纯化蛋白的条带清晰且单一，条带指示大小与蛋白分子理论大小一致，说明经此表达和纯化方法，这四个蛋白均得到有效表达和纯化。

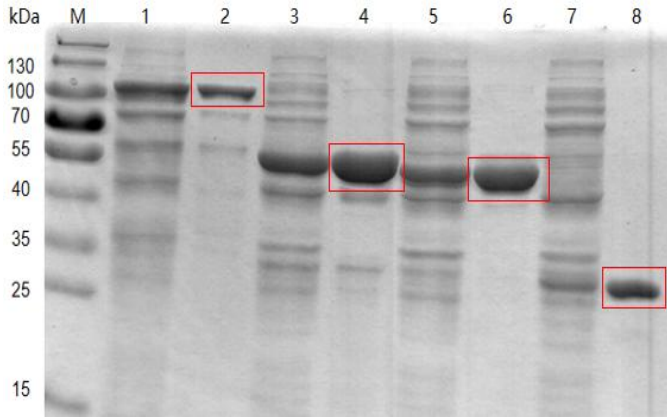


图 3 α GP、PGM、PGI、ManA 表达纯化 SDS-PAGE 分析图

Fig.3 SDS-PAGE for the expression and purification of α GP,PGM,PGI,ManA

注：M：蛋白 marker；1： α GP 的可溶性蛋白；2： α GP 的纯化蛋白；3：PGM 的的可溶性蛋白；4：PGM 的纯化蛋白；5：PGI 的的可溶性蛋白；6：PGI 的纯化蛋白；7：ManA 的的的可溶性蛋白；8：ManA 的纯化蛋白。

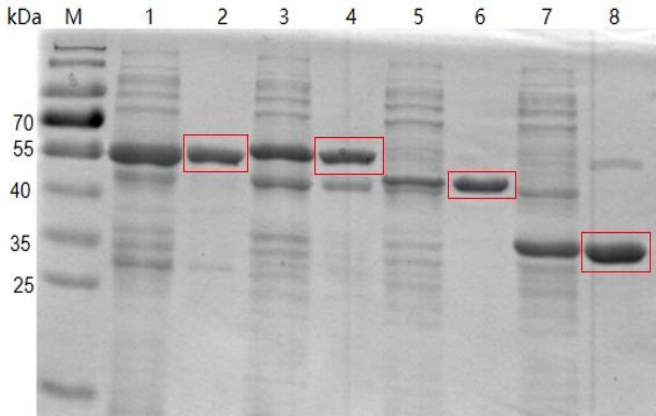


图 4 ManB、ManC、Gmd、WcaG 表达纯化 SDS-PAGE 分析图

Fig.4 SDS-PAGE for the expression and purification of ManB,ManC,Gmd,WcaG

注：M：蛋白 marker；1：ManB 的可溶性蛋白；2：ManB 的纯化蛋白；3：ManC 的的可溶性蛋白；4：ManC 的纯化蛋白；5：Gmd 的的可溶性蛋白；6：Gmd 的纯化蛋白；7：WcaG 的的的可溶性蛋白；8：WcaG 的纯化蛋白。

ManB、ManC、Gmd、WcaG 的蛋白分子量大小分别为 52、55.1、44.6、37.7 kDa，如图 4 所示：ManB、ManC、

Gmd、WcaG 均得到可溶性过表达，四种纯化蛋白的条带清晰且单一，条带指示大小与蛋白分子理论大小一致，说明经此表达和纯化方法，这四个蛋白均得到有效表达和纯化。

综上，所有途径酶均成功在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中可溶性表达，并通过层析法得到有效纯化。

2.1.3 体外多酶法合成 GDP-L-岩藻糖体

对完整合成途径进行了反应和检测，其 HPLC 分析和 GDP-L-岩藻糖标准曲线如图 5 所示：反应样在目标产物 GDP-L-岩藻糖保留时间处有明显出峰，而反应前样品在 GDP-L-岩藻糖保留时间处没有出峰，说明反应样有 GDP-L-岩藻糖生成，构建的体外多酶级联催化体系能够实现 GDP-L-岩藻糖的合成，所用检测方法能够实现对其定性分析，其它杂峰对 GDP-L-岩藻糖对应的峰并未产生干扰，GDP-L-岩藻糖标准曲线具有很好的线性，所用检测方法能够实现对其准确定量分析。

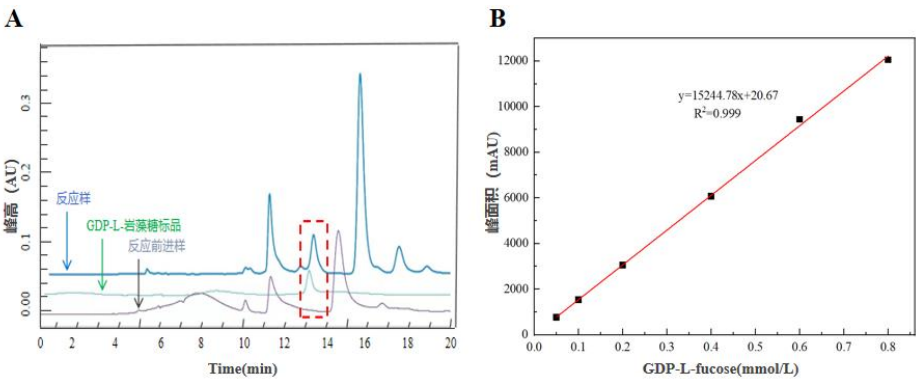


图 5 体外合成体系 GDP-L-岩藻糖鉴定分析

Fig.5 Analysis of the synthesis system. (A) HPLC analysis of the reaction; (B)The standard curve of GDP-L-fucose

2.2 多酶催化体系反应条件的优化

2.2.1 温度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

实验设置的温度范围为 30~80 ℃，其结果如图 6 所示：在 30~55 ℃ 范围内，随着温度的提高，GDP-L-岩藻糖的产量明显上升，提高反应温度有利于 GDP-L-岩藻糖的合成；在大于 55 ℃ 时，随着温度的提高，GDP-L-岩藻糖的产量逐渐降低，不利于 GDP-L-岩藻糖的合成；其最适反应温度为 55 ℃。针对其最适反应温度为 55 ℃，低于前六个酶最适反应温度的实验结果，推测可能原因为新挖掘的后面两个酶 Gmd 和 WcaG 的最适反应温度较低。

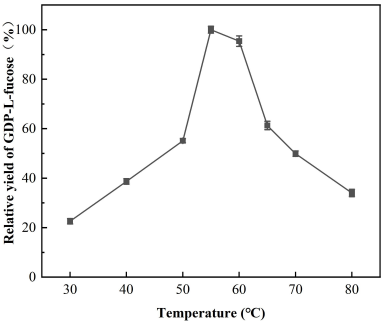


图 6 温度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.6 Effect of temperature on GDP-L-fucose production

2.2.2 pH 值对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

在对反应 pH 值对 GDP-L-岩藻糖合成的影响进行探究时，设置了 4.5~8.0 的 pH 值范围，其结果如图 7 所示：较低的 pH 值更有利于 GDP-L-岩藻糖的合成，其最适反应 pH 值在 5.0，但 4.5~6.0 之间没有显著性差距。在 pH<7.0 时，磷酸盐缓冲液的产率明显高于 Tris-HCl 缓冲液，这可能与磷酸盐缓冲液能提供反应所需的磷酸根离子有关；

在 pH>7.0 时，磷酸盐缓冲液的产率迅速降低且低于 Tris-HCl 缓冲液，猜测可能与磷酸盐缓冲液偏酸性的缓冲范围有关，当 pH>7.0 时，磷酸盐缓冲液的缓冲能力弱于 Tris-HCl 缓冲液，其实际 pH 偏移最适反应 pH 较大，导致目的产物产率低于后者。综上，选用 pH5.0 的磷酸盐缓冲液作为合成反应的缓冲液。

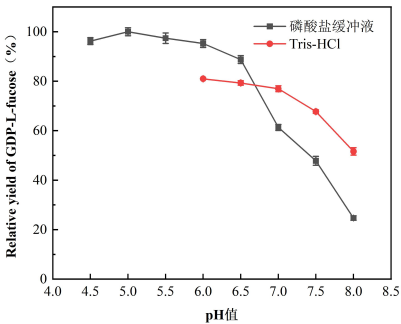


图 7 pH 值对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.7 Effect of pH on GDP-L-fucose production

2.2.3 途径酶配比对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

合成途径共涉及到 8 个途径酶，在对它们的质量浓度配比对 GDP-L-岩藻糖合成的影响进行探究时，先通过正交实验探究了各个酶对 GDP-L-岩藻糖合成的不同影响，其实验数据结果经多因素方差分析和极差分析结果见表 2 和表 3。

由表 2 可知，八个途径酶中，只有 Gmd 的质量浓度会对 GDP-L-岩藻糖合成产生显著性影响，其余七个途径酶对 GDP-L-岩藻糖合成均不会产生显著性影响，合理推测 Gmd 质量浓度是影响 GDP-L-岩藻糖的限制性因素。

接着对 Gmd 质量浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响进行了更具体的单因素优化，实验设置的 Gmd 质量浓度范围为 0.05~0.6 g/L。其结果如图 8 所示：在 0.05~0.4 g/L 范围内，随着 Gmd 质量浓度的提升，GDP-L-岩藻糖产量明显提高，当其大于 0.4 g/L 时，GDP-L-岩藻糖产量并无显著性提高，其最适反应质量浓度在 0.4 g/L。结合表 3 预测的酶的最佳质量浓度配比，得出反应体系途径酶的最佳质量浓度配比为 αGP:PGM:PGI:ManA:ManB:ManC:Gmd:WcaG=3:2:2:3:3:2:8:2。

表 2 实验结果方差分析

Table 2 Analysis of variance of experimental result					
	平方和	df	均方	F	P
截距	103 895.308	1	103 895.308	1 109.192	<0.01
αGP	243.250	2	121.675	1.299	0.315
PGM	278.988	2	139.494	1.489	0.272
PGI	298.093	2	149.046	1.591	0.251
ManA	318.644	2	159.322	1.701	0.231
ManB	44.359	2	22.170	0.237	0.793
ManC	87.461	2	43.730	0.467	0.640
Gmd	10 167.356	2	5 083.678	54.274	<0.01
WcaG	164.289	2	82.145	0.877	0.446
残差	936.676	10	93.668		

注：df: 自由度; F: F 检验; P: 显著性分析, P<0.05 时，表示此因素对实验结果有显著性影响; R²=0.925。

表 3 实验结果极差分析

Table 3 Analysis of range of experimental result									
项	水平	αGP	PGM	PGI	ManA	ManB	ManC	Gmd	WcaG
K 值	1	520.68	544.92	518.55	564.49	550.81	535.38	328.63	541.05

	2	571.23	598.46	590.70	517.70	549.47	569.83	594.40	589.63
	3	582.95	531.48	565.62	592.67	574.58	569.65	751.84	544.18
	1	57.85	60.55	57.62	62.72	61.20	59.49	36.51	60.12
Kavg 值	2	63.47	66.50	65.63	57.52	61.05	63.31	66.04	65.51
	3	64.77	59.05	62.85	65.85	63.29	63.29	83.54	60.46
最佳水平	3	2	2	3	3	2	3	2	
R		6.92	7.44	8.02	8.33	2.79	3.83	47.02	5.40
水平数量		3	3	3	3	3	3	3	3
每水平重复数 r		9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0

注：三个水平对应的酶的质量浓度分别为 0.1、0.2、0.3 g/L

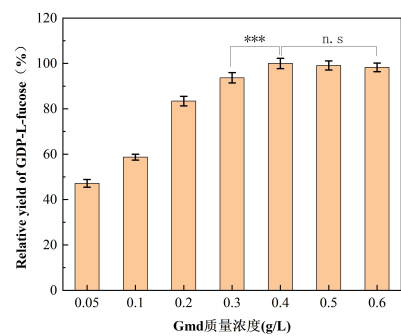


图 8 Gmd 质量浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.8 Effect of Gmd on GDP-L-fucose production

注：n.s 无显著性差异 ($P>0.05$)，***差异极显著 ($P<0.0001$)。

2.2.4 Mg^{2+} 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

实验设置的浓度变化范围为 0.5~20 mmol/L。实验结果如图 9 所示：在较低的浓度范围 0.5~2 mmol/L 内，提高 Mg^{2+} 浓度有利于 GDP-L-岩藻糖的合成，当其浓度大于 2 mmol/L 时，提高 Mg^{2+} 浓度，GDP-L-岩藻糖产量明显降低，其最适浓度在 2 mmol/L，故此选择 2 mmol/L 作为后续反应的 Mg^{2+} 浓度。

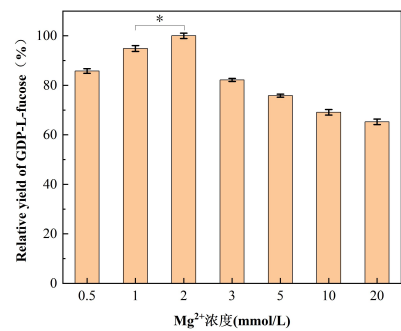


图 9 Mg^{2+} 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.9 Effect of Mg^{2+} on GDP-L-fucose production

注：*差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.5 NADPH 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

设置的浓度变化范围为 0.5 mM~5 mM。实验结果如图 10 所示：在实验所探究的浓度范围内，NADPH 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成并无明显影响，其中，GDP-L-岩藻糖最高产率出现在 3 mM 浓度点，故选择 3 mM 为其最适反应浓度用于后续研究。

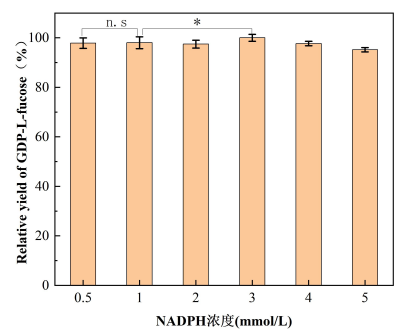


图 10 NADPH 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.10 Effect of NADPH on GDP-L-fucose production

注：n.s 无显著性差异 ($P>0.05$)，*差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.6 磷酸盐缓冲液浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

实验设置的浓度变化范围为 5~100 mmol/L。实验结果如图 11 所示：在较低的浓度范围 5~20 mmol/L 内，提高磷酸盐缓冲液浓度有利于 GDP-L-岩藻糖的合成，当其浓度大于 20 mmol/L 时，提高其浓度不利于 GDP-L-岩藻糖的合成，在 5~100 mmol/L 的浓度范围内，其最适浓度为 20 mmol/L，所以选择 20 mmol/L 作为后续合成反应的磷酸盐缓冲液浓度。

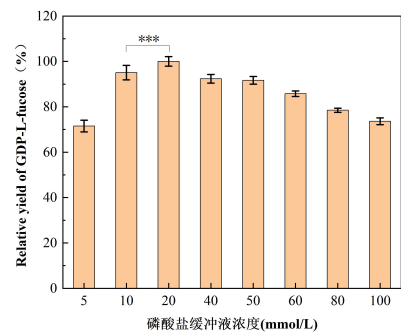


图 11 磷酸盐缓冲液浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.11 Effect of the concentration of PBS on GDP-L-fucose production

注：***差异极显著 ($P<0.0001$)。下图同。

2.2.7 GTP 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

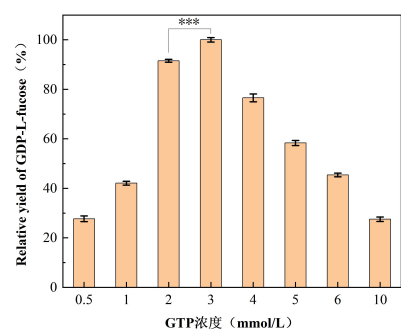


图 12 GTP 浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.12 Effect of GTP on GDP-L-fucose production

实验设置了 0.5 mmol/L~10 mmol/L 的反应浓度变化范围, 实验结果如图 12 所示: 在小于 3 mmol/L 浓度时, 提高 GTP 反应浓度有利于 GDP-L-岩藻糖的合成; 当其浓度大于 3 mmol/L 时, 提高 GTP 反应浓度不利于 GDP-L-岩藻糖的合成, 其最适反应浓度在 3 mmol/L。所以选择 3 mmol/L 为其最适反应浓度用于后续研究。

2.2.8 淀粉质量浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

实验设置了 0.1~5 g/L 的质量浓度变化范围, 实验结果如图 13 所示: 随着淀粉质量浓度的提高, GDP-L-岩藻糖的产量随之提升, 但产率明显降低, 最高产率出现在最低的淀粉反应质量浓度; 推测随着淀粉质量浓度的提升, 相较于酶浓度, 淀粉过饱和, 未能实现低淀粉质量浓度下的快速转化。可以尝试通过提高酶反应浓度, 检测 GDP-L-岩藻糖合成的变化, 或者使用流加底物酶催化的方法使淀粉维持在一个较低的反应浓度使 GDP-L-岩藻糖合成维持较高的效率。为了实现 GDP-L-岩藻糖合成能达到一个较高的产率, 选择 1 g/L 作为其后续研究的淀粉反应质量浓度, 在此反应条件下, GDP-L-岩藻糖产率为 19.34%, 产量为 0.19 g/L。

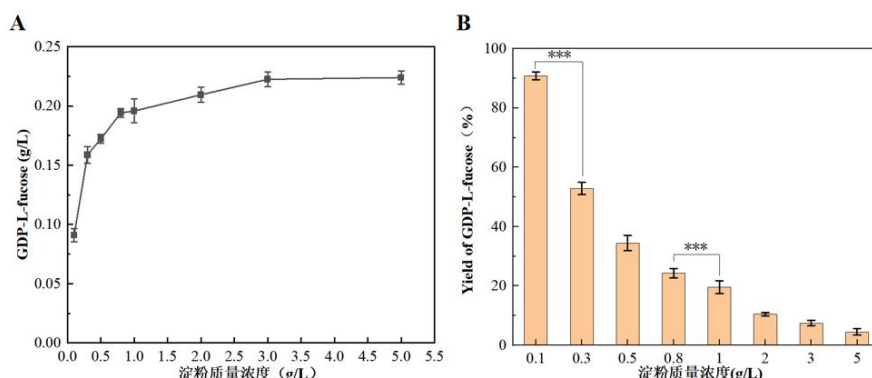


图 13 淀粉质量浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响

Fig.13 Effect of the concentration of starch on GDP-L-fucose production

2.2.9 多酶级联体系催化合成 GDP-L-岩藻糖反应曲线分析

在对以上因素完成优化后, 进行 GDP-L-岩藻糖的一锅法合成反应。在 2 mL 离心管装 200 μ L 反应体系中: 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 5.0), 2 mmol/L 的 $MgCl_2$, 3 mmol/L 的 GTP, 3 mmol/L 的 NADPH, 1 g/L 的淀粉, α GP、PGM、PGI、ManA、ManB、ManC、Gmd、WcaG 的反应质量浓度分别为 0.15、0.1、0.1、0.15、0.15、0.1、0.4、0.1 g/L。于 55 $^{\circ}C$ 、800 r/min 恒温混匀仪中反应, 于不同反应时间取样进行 HPLC 分析。

实验结果如图 14 所示: GDP-L-岩藻糖产率在 3 h 后上升很缓慢, 在 5 h 达到最高值 53.23%, 产量为 0.53 g/L, 在产率上与 Mahour R^[4]以甘露糖为底物经十一步反应催化合成 GDP-L-岩藻糖的研究有一定的差距, 其产率在反应 48 h 达到 72.00%。与之相比, 该研究的优势在于反应途径更短, 反应时间明显缩短, 淀粉底物比甘露糖也更加廉价易得; 其中, 反应在 5 h 后 GDP-L-岩藻糖产率不再上升, 推测由反应 5 h 后存在部分酶稳定性下降所致, 后续可具体探究途径酶热稳定性对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。

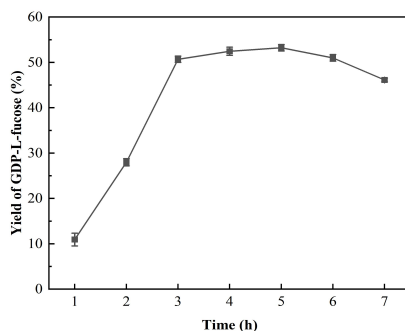


图 14 体系条件优化后 GDP-L-岩藻糖合成时间曲线

Fig.14 Catalytic reaction curves of GDP-L-fucose after system optimization

3 结论

本研究设计了一条 8 酶级联催化淀粉合成 GDP-L-岩藻糖的新途径,在此基础上,构建体外多酶级联体系成功合成 GDP-L-岩藻糖,此前体外多酶级联催化合成 GDP-L 岩藻糖所用底物多为昂贵的单糖,如甘露糖和岩藻糖,还未有从淀粉合成 GDP-L-岩藻糖的报道。

探究了合成体系中反应温度、pH、酶配比、 Mg^{2+} 浓度、NADPH 浓度、缓冲液浓度、底物浓度对 GDP-L-岩藻糖合成的影响。最适反应温度和 pH 值分别为 55 °C、pH 5.0,途径酶的最佳质量浓度配比为 $\alpha GP:PGM:PGI:ManA:ManB:ManC:Gmd:WcaG=3:2:2:3:3:2:8:2$, Mg^{2+} 最适浓度为 2 mmol/L, NADPH 最适浓度为 3 mmol/L,磷酸盐缓冲液的最适浓度为 20 mmol/L。在最适反应条件下,以 1 g/L 淀粉反应,一锅法反应 5 h, GDP-L-岩藻糖产率达到 53.23%,产量为 0.53 g/L。后续研究可对合成工艺进行探究以进一步提高 GDP-L-岩藻糖合成的效率,如提高酶的浓度以及分步法反应。同时,针对途径较长,蛋白层析纯化工作繁琐的问题,可尝试通过热处理对蛋白进行纯化,或者利用粗酶进行合成反应。

参考文献

- [1] 万李.构建大肠杆菌细胞工厂生产 GDP-L-岩藻糖[D].无锡:江南大学,2021.
- [2] 史然,江正强.2'-岩藻糖基乳糖的酶法合成研究进展和展望[J].合成生物学,2020,1(4):481.
- [3] LI S, WANG S, WANG Y, et al. Gram-scale production of sugar nucleotides and their derivatives [J]. Green Chemistry, 2021, 23(7): 2628-2633.
- [4] MAHOUR R, MARICHAL P A, REXER T F, et al. Multi-enzyme cascades for the *in vitro* synthesis of guanosine diphosphate L-fucose [J]. ChemCatChem, 2021, 13(8): 1981-1989.
- [5] KOIZUMI S, ENDO T, TABATA K, et al. Large-scale production of GDP-fucose and Lewis X by bacterial coupling [J]. Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(4): 213-217.
- [6] WANG W, HU T, FRANTOM P A, et al. Chemoenzymatic synthesis of GDP-L-fucose and the Lewis X glycan derivatives [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106(38): 16096-16101.
- [7] HUBER N, ALCALÁ-OROZCO E A, REXER T, et al. Model-based optimization of cell-free enzyme cascades exemplified for the production of GDP-fucose [J]. Metabolic Engineering, 2024, 81: 10-25.
- [8] LEE W H, CHIN Y W, HAN N S, et al. Enhanced production of GDP-L-fucose by overexpression of NADPH regenerator in recombinant *Escherichia coli* [J]. Microbiology and Biotechnology, 2011, 91: 967-976.
- [9] CLAASSENS N J, BURGNER S, VOGELI B, et al. A critical comparison of cellular and cell-free bioproduction systems [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 60: 221-229.
- [10] AKUTSU J I, ZHANG Z, MORITA R, et al. Identification and characterization of a thermostable bifunctional enzyme with phosphomannose isomerase and sugar-1-phosphate nucleotidyltransferase activities from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii* OT3 [J]. Extremophiles, 2015, 19: 1077-1085.
- [11] MIZANUR R M, POHL N L J O, CHEMISTRY B, et al. Phosphomannose isomerase/GDP-mannose pyrophosphorylase from *Pyrococcus furiosus*: a thermostable biocatalyst for the synthesis of guanidinediphosphate-activated and mannose-containing sugar nucleotides [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2009, 7(10): 2135-2139.
- [12] 石婷,宋展,宋世怡,等.体外生物转化(*in vitro* BioTransformation, ivBT):生物制造的新前沿[D].上海:华东理工大学,2024.
- [13] 许可,吕波,李春,等.无细胞的合成生物技术—多酶催化与生物合成[J].中国科学:化学,2015,5:429-437.
- [14] REXER T, LAAF D, GOTTSCHALK J, et al. Enzymatic synthesis of glycans and glycoconjugates [J]. Advances in Glycobiotechnology, 2021, 175: 231-280.
- [15] RASOR B J, VOGELI B, LANDWEHR G M, et al. Toward sustainable, cell-free biomanufacturing [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 69: 136-144.
- [16] CAI T, SUN H, QIAO J, et al. Cell-free chemoenzymatic starch synthesis from carbon dioxide [J]. Science, 2021, 373(6562): 1523-1527.
- [17] 江金鹏,吴旭日,陈依军,等.解决氧化还原酶反应体系中辅酶问题的策略及其应用[J].生物工程学报,2012,28(4):410-419.
- [18] ENGELMANN C, JOHANNSEN J, WALUGA T, et al. A multi-enzyme cascade for the production of high-value aromatic compounds [J]. Catalysts, 2020, 10(10): 1216.
- [19] YOU C, SHI T, LI Y, et al. An *in vitro* synthetic biology platform for the industrial biomanufacturing of myo-inositol from starch [J].

- Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(8): 1855-1864.
- [20] ZHANG Y H P J B. Production of biocommodities and bioelectricity by cell-free synthetic enzymatic pathway biotransformations: challenges and opportunities [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2010, 105(4): 663-677.
- [21] HUFFMAN M A, FRYSZKOWSKA A, ALVIZO O, et al. Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir [J]. Science, 2019, 366(6470): 1255-1259.
- [22] ZHOU W, YOU C, MA H, et al. One-pot biosynthesis of high-concentration α -glucose 1-phosphate from starch by sequential addition of three hyperthermophilic enzymes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(8): 1777-1783.
- [23] WANG W, LIU M, YOU C, et al. ATP-free biosynthesis of a high-energy phosphate metabolite fructose 1,6-diphosphate by in vitro metabolic engineering [J]. Metabolic Engineering, 2017, 42: 168-174.
- [24] YEOM S J, KIM Y S, LIM Y R, et al. Molecular characterization of a novel thermostable mannose-6-phosphate isomerase from *Thermus thermophilus* [J]. Biochimie, 2011, 93(10): 1659-1667.
- [25] ZHANG P, SHAO Z, LI L, et al. Molecular characterisation and biochemical properties of phosphomannomutase/phosphoglucomutase (PMM/PGM) in the brown seaweed *saccharina japonica* [J]. Journal of Applied Phycology, 2018, 30: 2687-2696.
- [26] REXER T F T, SCHILDBACH A, KLAPPROTH J, et al. One pot synthesis of GDP-mannose by a multi-enzyme cascade for enzymatic assembly of lipid-linked oligosaccharides [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2018, 115(1): 192-205.