

丝状自组装蛋白支架介导的双酶级联催化体系构建促进 D-塔格糖合成

李英¹, 刘伟^{1*}, 朱丽英², 周治³, 江凌^{1,4*}

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏南京 210009)(2. 南京工业大学化学与分子工程学院, 江苏南京 210009)

(3. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏南京 210009)

(4. 南京工业大学材料化学工程国家重点实验室, 江苏南京 210009)

摘要: D-塔格糖是一种稀有的己酮糖, 具有低能量、高甜度, 在食品领域具有广泛的应用。目前, D-塔格糖的生物合成大多聚焦于异构酶途径及关键酶 L-阿拉伯糖异构酶的挖掘与改造, 多酶级联催化的应用较少, 且受热力学平衡影响转化率较低。该研究首先构建并表征了来源于 *Methanocaldococcus jannaschii* 的丝状自组装蛋白支架 EE/KK, 结果显示, 其在胞内外均可实现有效的荧光蛋白级联互作。其次, 在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中应用 EE/KK 蛋白支架级联组装 D-木糖还原酶 (SsXR, *Scheffersomyces stipitis* 来源的 NAD(P)H-dependent D-xylose Reductase) 和半乳糖醇脱氢酶 (RIGDH, *Rhizobium leguminosarum* 来源的 SDR Family Oxidoreductase), 强化基于氧化还原酶途径合成 D-塔格糖的效率。相较于游离体系, EE/KK 级联体系的 D-塔格糖产量提高 50%。进一步对级联体系重组菌株 BL21-EX/KG (EX 和 KG 分别为 EE-SsXR 和 KK-RIGDH 蛋白复合体的缩写) 发酵条件进行优化, 结果表明: 以 Luria-Bertani (LB) 培养基为发酵培养基, 温度 20 °C, 0.1 mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside, IPTG) 下, 以 10 g/L 乳糖为底物, D-塔格糖产量可达 3.93 g/L, 对乳糖转化率为 0.39 g/g, 为理论转化率 (0.53 g/g) 的 74%, 高于大多数以乳糖为底物合成 D-塔格糖的报道。该研究为 D-塔格糖生物合成提供潜在的高效菌株以及多酶级联组装提供有效的工具。

关键词: 自组装; 蛋白支架; D-塔格糖; 多酶级联催化

文章编号: 1673-9078(2023)11-48-57

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1590

Construction of A Filamentous Self-assembling Protein Scaffold-mediated Dual-enzyme Catalytic Cascade System for Enhanced D-Tagatose Synthesis

LI Ying¹, LIU Wei^{1*}, ZHU Liying², ZHOU Zhi³, JIANG Ling^{1,4*}

(1.College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

(2.School of Chemistry and Molecular Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

(3.College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

(4.State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 210009, China)

Abstract: D-tagatose is a rare hexose that is weakly metabolized but highly sweet. It is thus broadly useful in the food industry. Most current biosyntheses of D-tagatose utilize wild type and modified versions of the key enzyme L-arabinose isomerase. The use of a multi-enzyme catalytic cascade system for enhanced D-tagatose synthesis [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11):48-57

李英,刘伟,朱丽英,等.丝状自组装蛋白支架介导的双酶级联催化体系构建促进 D-塔格糖合成[J].现代食品科技,2023,39(11):48-57

LI Ying, LIU Wei, ZHU Liying, et al. Construction of a filamentous self-assembling protein scaffold-mediated dual-enzyme catalytic cascade system for enhanced D-tagatose synthesis [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 48-57

收稿日期: 2022-12-17

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2102700); 国家自然科学基金项目 (32101887; 31922070; U2106228); 江苏省双创博士项目 (JSSCBS20210398)

作者简介: 李英 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 多酶级联酶工程合成食品营养素, E-mail: ly335758@163.com

通讯作者: 刘伟 (1991-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 基于酶工程与代谢工程的食物营养素合成, E-mail: liuwei6775@njtech.edu.cn; 共同通讯作者: 江凌 (1982-),

男, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶资源与极端微生物资源, E-mail: jiangling@njtech.edu.cn

catalytic cascade to synthesize D-tagatose remains under-explored, while existing methods often exhibit a poor conversion rate due to thermodynamic equilibrium constraints. In this study, we constructed and characterized a filamentous self-assembled protein scaffold EE/KK derived from *Methanocaldococcus jannaschii*. This scaffold facilitates efficient cascade interactions between fluorescent proteins both intracellularly and extracellularly. Using this scaffold, D-xylose reductase (SsXR, an NAD(P)H-dependent D-xylose reductase derived from *Scheffersomyces stipitis*) and galactitol dehydrogenase (RIGDH, an SDR family oxidoreductase derived from *Rhizobium leguminosarum*) were assembled in *Escherichia coli* BL21(DE3). This approach significantly enhanced the efficiency of D-tagatose synthesis through the oxidoreductase pathway. D-tagatose yield in the EE/KK cascade system increased by 50% relative to that from the free-fraction system. Further optimization of fermentation conditions in the recombinant strain BL21-EX/KG (where EX and KG denote the protein complexes EE-SsXR and KK-RIGDH, respectively) revealed that using Luria-Bertani (LB) medium at 20 °C, with 0.1 mmol/L isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside and 10 g/L lactose as substrate yielded 3.93 g/L D-tagatose, corresponding to a lactose conversion rate of 0.39 g/g, or 74% of the theoretical complete conversion rate (0.53 g/g), outperforming most reports of D-tagatose synthesis using lactose as a substrate. This research introduces a promising *E. coli* strain for efficient D-tagatose biosynthesis, and an effective tool for assembly of multi-enzyme catalytic cascades.

Key words: self-assembly; protein scaffold; D-tagatose; multi-enzyme catalytic cascade

D-塔格糖的甜度高达蔗糖的 92%，但能量仅含蔗糖三分之一，具有降血糖^[1,2]、改善肠道菌群^[3]、抗氧化^[4]的作用，在食品和医药领域有广泛应用。D-塔格糖的合成主要通过化学法和生物法。化学法^[5]合成过程不易控制且副产物难以分离限制了其应用。目前，商业化的 D-塔格糖通常是由 D-半乳糖经过 L-阿拉伯糖异构酶 (L-AI, EC 5.3.1.4) 的异构化生产^[6]。然而，L-AI 的固有热力学平衡以及 D-半乳糖和 D-塔格糖之间的性质相似，仍然存在转化率有限和纯化成本高的问题^[7]。除了通过 L-AI 转化 D-半乳糖途径外，还可通过半乳糖醇脱氢酶将半乳糖醇一步转化为 D-塔格糖。Muniruzzaman 等^[8]使用 *Enterobacter agglomerans* 221e 菌株生产 D-塔格糖，半乳糖醇转化率高达 92%。除了发酵法，Zhang 等^[9]通过在胞外偶联半乳糖醇脱氢酶和再生 NAD⁺ 的 NADH 氧化酶，以 100 mmol/L D-半乳糖醇为底物，12 h 后的产率达 90%。虽然利用 D-半乳糖醇产 D-塔格糖产率高，但是半乳糖醇价格昂贵，直接利用其做底物不符合经济效益。为降低底物成本，乳糖或富含乳糖的工业废物是研究者常用的廉价底物。Jia 等^[10]利用重组大肠杆菌粗酶液可实现以 100 g/L 乳糖的乳清粉为原料，制得 23.50 g/L D-塔格糖。氧化还原反应转化率高，且没有复杂的副产物，是理想的途径。

有研究表明氧化还原反应中，辅因子限制是影响产量的重要因素^[11]。半乳糖醇脱氢酶在将半乳糖醇转化为 D-塔格糖的同时需要消耗辅因子。为避免大量添加外源辅因子且提高产量，多酶级联方式的利用具有重要意义。多酶级联催化已经成为生产高价值产物的重要方式^[12-15]，由于其“绿色”、高效、可持续等。同时，由于底物通道^[16]或空间临近效应^[17,18]，可

以使得一个酶的产物快速成为另一个酶的底物，加快反应速度^[19]。基于蛋白质的生物分子支架是目前应用最广泛的多酶固定化材料之一，由于其可进行基因编辑，可由细菌合成、组装条件温和且经济^[20-22]。Clark 等^[23]将从深海嗜热菌詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 中分离出的预折叠蛋白的单个亚基 γ -PFD (γ -Prefoldin) 突变成可通过静电相互作用有序排列的 EE、KK 单体，单体的 N-或 C-端很容易设计来连接功能分子。并利用了荧光蛋白对 (mCerulean3、mVenus)，证明了其可在胞外自组装^[24]，表明其有作为支架固定酶的潜力。然而，并未进一步探究其胞内应用。

基于此，在大肠杆菌中异源表达树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis* CBS 6054) 的 D-木糖还原酶 (SsXR) 和豌豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841) 来源的半乳糖醇脱氢酶 (RIGDH)，通过大肠杆菌内源性 β -半乳糖苷酶将乳糖转化为半乳糖，SsXR 将半乳糖转化为半乳糖醇，RIGDH 将其进一步转化为 D-塔格糖。为降低中间产物的流失，利用蛋白支架 EE、KK 分别与 SsXR、RIGDH 进行融合，依靠支架的静电相互作用实现双酶级联，提高 D-塔格糖合成效率 (图 1)，并对其摇瓶中发酵条件进行优化探究，以期 D-塔格糖的高效生物合成提供潜在菌株。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

1.1.1 菌株和质粒

DH5 α 、BL21 大肠杆菌感受态购买自生工生物工程 (上海) 有限公司，本研究用菌株和质粒见表 1。

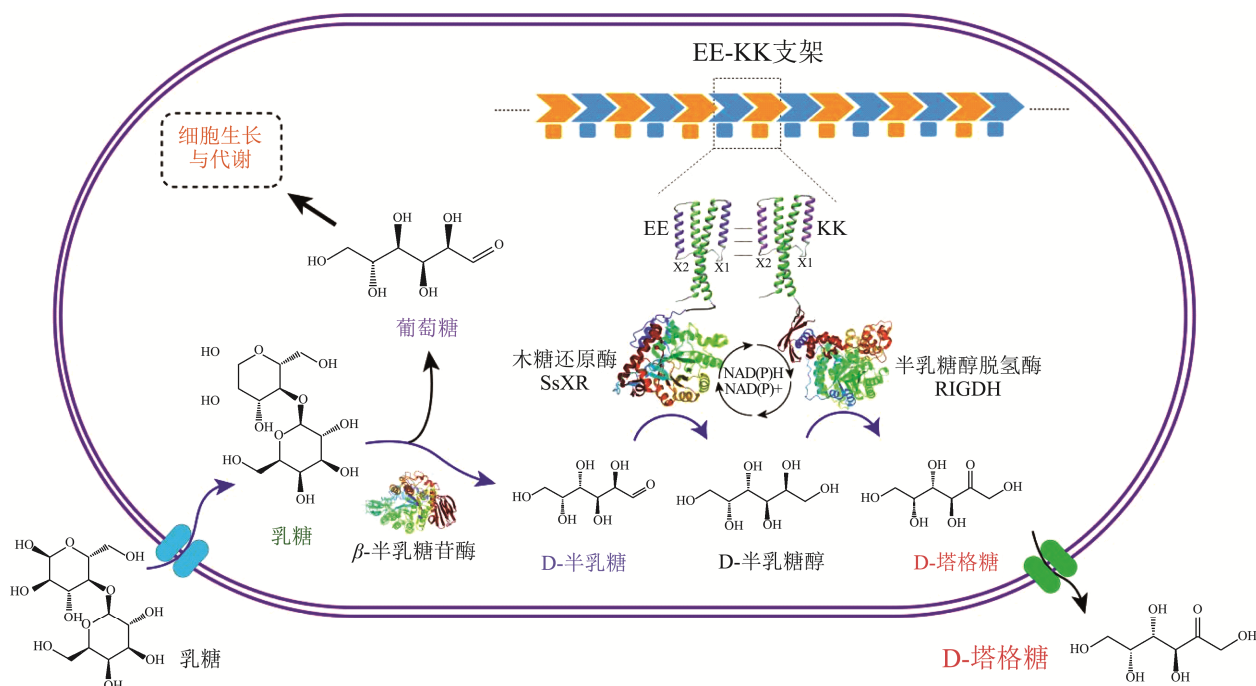


图 1 基于 EE-KK 自组装蛋白支架级联氧化还原酶合成 D-塔格糖示意图

Fig.1 Schematic diagram of D-tagatose synthesis by cascaded oxidoreductase via self-assembled protein scaffold EE/KK

表 1 本研究所用的质粒和菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	相应特征	来源
pETDuet-SnoopCatcher-Ssxr-SpyCatcher-Rlgdh	Amp ^r	实验室保藏
pCDFDuet-EE-snoopCatcher	Str ^r	实验室保藏
pETDuet-KK-spyCatcher	Amp ^r	实验室保藏
24Ura-C-EGFP	Amp ^r	实验室保藏
23Leu-N-EGFP	Amp ^r	实验室保藏
pETDuet-KK-mCherry	Amp ^r	实验室保藏
pCDFDuet-EE-GFP	Str ^r	实验室保藏
pETDuet	Amp ^r	实验室保藏
pCDFDuet	Str ^r	实验室保藏
pCDF-Ssxr	Str ^r	本研究构建
pCDF-EE-Ssxr	Str ^r	本研究构建
pET-Rlgdh	Amp ^r	本研究构建
pET-KK-Rlgdh	Amp ^r	本研究构建
pETDuet-KK-C-EGFP	Amp ^r	本研究构建
pCDFDuet-EE-N-EGFP	Str ^r	本研究构建
pETDuet-C-EGFP	Amp ^r	本研究构建
pCDFDuet-N-EGFP	Str ^r	本研究构建
BL21-N/C	Amp ^r , Str ^r ; pCDFDuet-N-EGFP 和 pETDuet-C-EGFP	本研究构建
BL21-EN/KC	Amp ^r , Str ^r ; pCDFDuet-EE-N-EGFP 和 pETDuet-KK-C-EGFP	本研究构建
BL21-X/G	Amp ^r , Str ^r ; pCDF-Ssxr 和 pET-Rlgdh	本研究构建
BL21-EX/KG	Amp ^r , Str ^r ; pCDF-EE-Ssxr 和 pET-KK-Rlgdh	本研究构建

1.1.2 主要生化试剂

蛋白胨、酵母粉, OXOID; 琼脂粉、氯化钠, 国药集团; 琼脂糖、D-塔格糖、L-半胱氨酸盐酸盐无水物, 源叶生物科技有限公司; 乳糖、咪唑, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 硫酸, 永华化学科技(江苏)有限公司; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠, 西陇科学股份有限公司; *Bam*H I、*Xho*I 等限制性核酸内切酶购于 TaKaRa 公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、小量质粒提取试剂盒、同源重组试剂盒和胶回收试剂盒购于南京诺维赞生物科技有限公司; Ni 预装重力柱、变性丙烯酰胺凝胶快速制备试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

Buffer A: 20 mmol/L 咪唑、500 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 值 8.00。

Buffer B: 300 mmol/L 咪唑、500 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 值 8.00。

LB 液体培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、氯化钠 10。

LB 固体培养基 (g/L): 蛋白胨 10、酵母粉 5、氯化钠 10、琼脂粉 20。

TB 培养基 (g/L): 蛋白胨 12、酵母粉 24、甘油 10、磷酸二氢钾 2.30、磷酸氢二钾 12.50。

M9 培养基 (g/L): 七水合磷酸二氢钠 12.80、磷酸二氢钾 3、氯化钠 0.50、氯化铵 1、1 mol/L $MgSO_4$ 2 mL、20%葡萄糖溶液 20 mL、1 mol/L 氯化钙 0.10 mL, 补充水至 1 L。

1.2 主要仪器与设备

MQT-60R 摇床, 上海旻泉仪器有限公司; SHP-150 生化培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; HH-S2 数显恒温水浴锅, 江苏金怡仪器科技有限公司; GL-20G-II 台式冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; HN98 超声波信号发生器, 上海汗诺仪器有限公司; T960A 智能 PCR 仪, 杭州晶格科学仪器有限公司; 721N 紫外分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; 核酸电泳仪, 上海天能科技有限公司; F-7000 荧光光谱仪, 日立公司; 科乐比微量分光光度计, 德国伯赫。

1.3 方法

1.3.1 重组大肠杆菌的构建

以本实验室保藏的质粒为模版, 参照 NCBI 获得的 *Ss*XR、*R/GDH* (GenBank Accession No. 分别为 XP_001385181、WP_011650422) 和 *EE/KK* 基因序列设计引物进行 PCR 扩增, 如表 1 所示, 引物 *Bam*H I-*Ss*XR-F 和 *Ss*XR-*Xho*I-R、*Bam*H I-*R/GDH*-F 和

*R/GDH-Xho*I-R 所对应的模版为质粒 pETDuet-SnoopCatcher-*Ss*XR-SpyCatcher-*R/GDH* 分别扩增片段 *Ss*XR、*R/GDH*; 引物 r-*Ss*XR-F 和 *Ss*XR-*Xho*I-R (*r-R/GDH*-F 和 *R/GDH-Xho*I-R) 以 pETDuet-SnoopCatcher-*Ss*XR-SpyCatcher-*R/GDH* 质粒为模版, pET-*Bam*H I-KK-F 和 KK-R (pCDF-*Bam*H I-EE-F 和 EE-R) 所对应的模版为质粒 pETDuet-KK-spyCatcher (pCDFDuet-EE-snoopCatcher); 获取的片段通过引物 pET-*Bam*H I-KK-F (pCDF-*Bam*H I-EE-F) 和 *Ss*XR-*Xho*I-R (*R/GDH-Xho*I-R) 融合 PCR 扩增得到 KK-*Ss*XR (EE-*R/GDH*)。PCR 反应条件如下: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 退火温度根据引物 T_m 值设定, 72 °C 延伸, 延伸时间根据序列长度设定, 33 个循环后在 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物通过 0.80% 的琼脂糖凝胶电泳验证。*Ss*XR、*R/GDH*、KK-*Ss*XR 和 EE-*R/GDH* 片段通过 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切连接到载体上 (pETDuet、pCDFDuet)。通过 T4 连接酶 16 °C 过夜连接并导入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中。利用抗性基因平板筛选进行菌落 PCR 验证, 提取质粒送至通用生物(安徽)股份有限公司进行测序, 利用 snapgene 软件进行同源比对, 确定插入序列正确性, 得到正确的质粒 pCDF-*Ss*XR、pCDF-EE-*Ss*XR、pET-*R/GDH*、pET-KK-*R/GDH*。最后将提取得到的正确质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞得到重组菌 (对照组: BL21-X/G、实验组: BL21-EX/KG)。

用相同的方法, 利用引物 pET-KK-gj-R 和 pET-KK-gj-F, pCDF-EE-gj-R 和 pCDF-EE-gj-F 分别以 pET-KK-*R/GDH* 和 pCDF-EE-*Ss*XR 为模版得到片段 pET-KK-gj 和 pCDF-EE-gj, 引物 C-EGFP-F 和 C-EGFP-R, N-EGFP-F 和 N-EGFP-R 分别以 24Ura-C-EGFP 和 23Leu-N-EGFP 为模版获得片段 C-EGFP 和 N-EGFP。利用同源重组连接并导入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中。获得质粒 pETDuet-KK-C-EGFP、pCDFDuet-EE-N-EGFP。引物 *Bam*H I-C-EGFP-F 和 *Xho*I-C-EGFP-R, *Bam*H I-N-EGFP-F 和 *Xho*I-N-EGFP-R 分别以 24Ura-C-EGFP 和 23Leu-N-EGFP 为模版获得片段 C-EGFP 和 N-EGFP 通过双酶切连接到载体上, 利用通过 T4 连接酶 16 °C 过夜连接并导入 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中, 通过验证得到 pETDuet-C-EGFP 和 pCDFDuet-N-EGFP。最后将提取得到的正确质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞得到重组菌游离组 (BL21-N/C) 和支架组 (BL21-EN/KC)。本研究使用的引物序列参见表 2。

表2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

质粒	Primer name	Primer sequence(5'→3')	酶切位点
pCDF-Ssxr	<i>Bam</i> H I-SsXR-F	CGCGGATCCGATGCCGAGTATTAAGCTGAATAG	<i>Bam</i> H I
	SsXR- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTAAACAAAAATCGGAATTTTATC	<i>Xho</i> I
pCDF-EE-Ssxr	r-SsXR-F	GAGGTGGCAGCATGCCGAGTATTAAGCTGAATAG	
	SsXR- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTAAACAAAAATCGGAATTTTATC	<i>Xho</i> I
	pCDF- <i>Bam</i> H I-EE-F	CGCGGATCCGATGGGTCATCATCACCATCATC	<i>Bam</i> H I
	EE-R	CTTAATACTCGGCATGCTGCCACCTCCACCGCTAC	
pET-Rlgdh	<i>Bam</i> H I-RIGDH-F	CGCGGATCCGATGAGCTATCAGCAGAAATTC	<i>Bam</i> H I
	RIGDH- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTACCAGCAGGTAAAACC	<i>Xho</i> I
pET-KK-Rlgdh	r-RIGDH-F	GTGGAGGTGGCAGCATGAGCTATCAGCAGAAATTC	
	RIGDH- <i>Xho</i> I-R	CCGCTCGAGTTACCAGCAGGTAAAACC	<i>Xho</i> I
	pET- <i>Bam</i> H I-KK-F	CGCGGATCCGGGTGGTGACATTAACGAAG	<i>Bam</i> H I
	KK-R	CTGATAGCTCATGCTGCCACCTCCACCGCTAC	
pETDuet-KK-C-EGFP	C-EGFP-F	GGCAGCGGTACCATGGGCAAGAACGGCATCAAGGTGAAC	
	C-EGFP-R	CCAGACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	
	pET-KK-gj-R	CGTTCCTTGCCCATGGTACCGTCCACCTCCACCGCTAC	
	pET-KK-gj-F	CTGTACAAGTAACTCGAGTCTGGTAAAGAAAC	
pCDFDuet-EE-N-EGFP	pCDF-EE-gj-R	GCTCACCATGGTACCGTCCACCTCCACCGCTAC	
	pCDF-EE-gj-F	CCGACAAGCAGTAACTCGAGTCTGGTAAAGAAAC	
	N-EGFP-F	GTGGCAGCGGTACCATGGTGGAGCAAGGGCGAGGAG	
	N-EGFP-R	CCAGACTCGAGTTACTGCTTGTCGGCCATGATATAG	
pETDuet-C-EGFP	<i>Bam</i> H I-C-EGFP-F	CGCGGATCCGATGGGCAAGAACGGCATCAAG	<i>Bam</i> H I
	<i>Xho</i> I-C-EGFP-R	CCGCTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	<i>Xho</i> I
pCDFDuet-N-EGFP	<i>Bam</i> H I-N-EGFP-F	CGCGGATCCGATGGTGGAGCAAGGGCGAGGA	<i>Bam</i> H I
	<i>Xho</i> I-N-EGFP-R	CCGCTCGAGTTACTGCTTGTCGGCCATGATATAG	<i>Xho</i> I

1.3.2 蛋白支架胞内外表征

1.3.2.1 EE-mCherry 和 KK-GFP 酶胞外自组装表征

有研究表明能观察荧光共振现象只能是两种荧光蛋白距离小于 10 nm 时^[25]。因此,利用已经构建的大肠杆菌 BL21/pCDF-EE-mCherry、BL21/pET-KK-GFP,将其在 37 °C 培养 OD₆₀₀ 到 0.60~0.80,加入 0.25 mmol/L IPTG, 20 °C 诱导 24 h 后, 6 000 r/min 10 min 收集菌体,用 50 mmol/L Tris HCl (pH 值 7.0) 清洗三次,重悬超声破碎,12 000 r/min 4 °C 离心 10 min 上清液通过 Ni 柱纯化,通过 Buffer A 去除杂蛋白后, Buffer B 洗脱目标蛋白,移入透析袋置于纯水中透析去除高浓度盐离子。利用 SDS PAGE 验证重组蛋白的可溶性表达,纯化的蛋白浓度通过科乐比微量分光光度计测定。将透析得到的纯蛋白 EE-mCherry 和 KK-GFP 以 1:0、1:0.5、1:1、1:2、1:4、1:12 在 50 mmol/L PBS (pH 值 7.0) 混合室温下自组装 1 h 后,荧光光谱仪测定荧光强度。

1.3.2.2 KK-C-EGFP 和 EE-N-EGFP 荧光蛋白胞内自组装表征

分裂成两部分的 C-EGFP 和 N-EGFP 荧光蛋白,只有当两个分裂组分被靶向靠近时,才能观察到荧光强度的增强,广泛应用在表征胞内的自聚集效果^[26,27]。因此,将重组菌(游离组:BL21-N/C 和支架组:BL21-EN/KC)接种于 5 mL LB,添加 5 μL 氨苄青霉素(100 mg/mL)和 5 μL 硫酸链霉素(50 mg/mL),37 °C 过夜培养。以 2% (V/V) 的接种量接种于 50 mL TB 培养基中,37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.60~0.80 时,添加终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 下诱导 24 h,取适量菌液离心、得到菌体用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 7.0) 洗涤菌体 3 次,重悬,通过稀释得到 OD₆₀₀ 相近的菌体重悬液,以 488 nm 为激发波长,518 nm 为发射波长测定荧光强度。

1.3.3 重组大肠杆菌发酵合成 D-塔格糖方法

从活化平板上挑取单菌落(游离组、支架组)接

种至 5 mL LB 液体培养基中, 添加相应的抗性, 37 °C、160 r/min 振荡培养过夜。以 2% (V/V) 的接种量, 接种于含 10 g/L 乳糖的 50 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.60~0.80 时, 添加终浓度为 0.25 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 下诱导与发酵培养。在规定的时点取样, 并测定 D-塔格糖产量。

1.3.4 摇瓶发酵条件优化

1.3.4.1 发酵培养基种类优化

选择 TB、M9 以及 LB 培养基, 其余条件不变, 按照 1.3.3 进行发酵。

1.3.4.2 发酵温度优化

以 LB 为培养基, 设置诱导与发酵温度为 16、20、25、30、37 °C, 其余条件不变, 按照 1.3.3 进行发酵。

1.3.4.3 诱导剂添加量优化

以 LB 为培养基, 诱导与发酵温度为 20 °C, 设置诱导剂添加量为 0.1、0.25、0.25、1 mmol/L, 其余条件不变, 按照 1.3.3 进行发酵。

1.3.5 D-塔格糖与乳糖测定方法

发酵液上清经 0.22 μm 滤膜过滤后, 采用 Carboxymix Ca-NP10 (10 μm, 交联度 8%, 7.80×300 mm) 柱的岛津高效液相色谱仪 (示差折光检测器) 分析测定 D-塔格糖与乳糖。流动相为 100% 水, 流速 0.40 mL/min, 85 °C, 洗脱 35 min。

1.3.6 数据分析

结果以实验的均数±标准差 (mean±SD) 表示, 每次实验 3 次重复。采用 Microsoft Excel 365 软件计算平均值和 SD 值; 采用 SPSS26.0 进行单因素方差分析确定显著性差异, n.s 无显著性差异 ($P>0.05$)、* 差异显著 ($P<0.05$)、** 差异非常显著 ($P<0.01$)、*** 差异极显著 ($P<0.0001$), 并用 Origin 2018 进行绘图。

2 结果分析

2.1 EE/KK 蛋白支架表征

2.1.1 EE-mCherry 和 KK-GFP 酶胞外自组装表征

为探究 EE/KK 支架是否具有自组装特性, 首先在胞外进行表征。将荧光蛋白 KK-mCherry、EE-GFP 通过镍柱纯化, SDS PAGE 结果表明 KK-mCherry、EE-GFP 可以形成良好的可溶性表达 (图 2)。以不同的化学计量比混合在 50 mmol/L PBS (pH 值 7.0) 孵育 1 h 后, 测定得到的荧光强度为 y 轴和波长为 x 轴得到图 3。图 3 表明, 随着 KK-mCherry 的量增加, GFP 在 510 nm 的荧光强度逐渐降低降低, 而 KK-mCherry 在 610 nm 处的荧光强度逐渐增加。这表明荧光蛋白对

形成了荧光共振, 证实 EE/KK 支架可以胞外自组装。

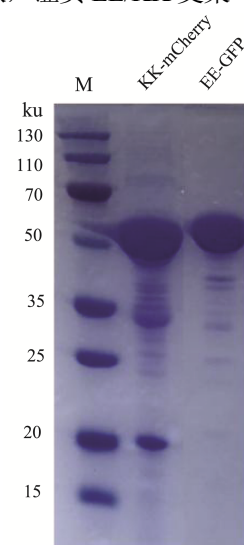


图 2 纯化的重组蛋白 KK-mCherry 和 EE-GFP 的 SDS PAGE

Fig.2 SDS PAGE of purified recombinant proteins

KK-mCherry and EE-GFP

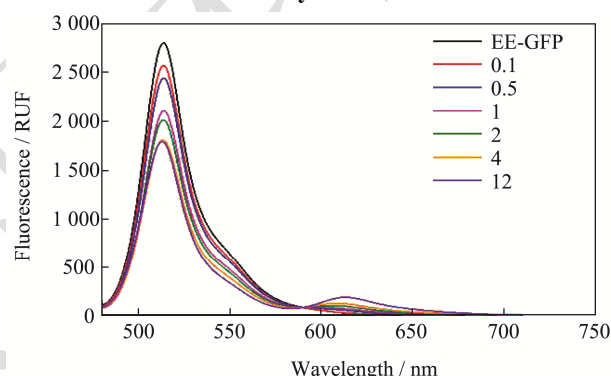
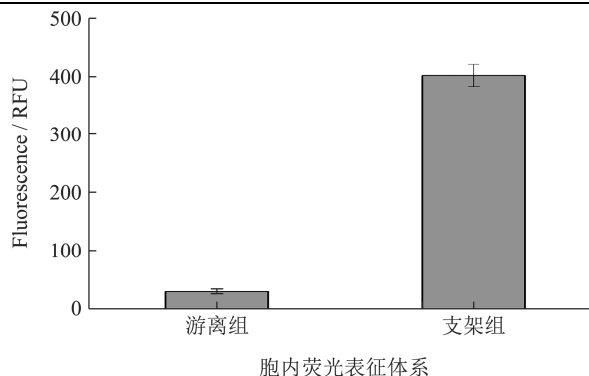


图 3 以不同摩尔比组装的 EE-GFP 和 KK-mCherry 荧光蛋白复合物的荧光发射光谱

Fig.3 Fluorescence emission spectra of EE-GFP and KK-mCherry fluorescent protein complexes assembled at different molar ratios

2.1.2 KK-C-EGFP 和 EE-N-EGFP 荧光蛋白胞内自组装表征

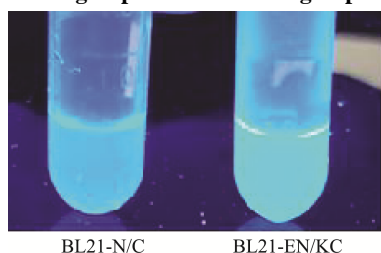
前面成功验证了支架可在胞外自组装。为进一步验证支架在胞内的自组装特性, 将构建的重组大肠杆菌游离组 (BL21-N/C) 和支架组 (BL21-EN/KC) 分别诱导, 使得荧光蛋白 (C-EGFP、N-EGFP) 和支架-荧光蛋白复合体 (KK-C-EGFP、EE-N-EGFP) 在胞内表达。取诱导液离心收集菌体。稀释得到相同 OD₆₀₀ 的菌液, 观察到支架组的荧光强度增加了约 13.33 倍 (图 4)。Lau 等^[26]在酿酒酵母中通过包封蛋白实现分裂的黄色荧光蛋白的荧光强度仅增大 2.5 倍。紫外灯照射下, 可见支架组的荧光强度显著高于游离组 (图 5)。以上结果表明, EE/KK 支架可在胞内成功自组装, 实现目标蛋白的级联。



胞内荧光表征体系

图4 游离组和支架组荧光强度对比图

Fig.4 Comparison chart of fluorescence intensity between the free group and the scaffold group



BL21-N/C BL21-EN/KC

图5 紫外光下的游离组 (BL21-N/C) 和支架组 (BL21-EN/KC) 菌液荧光对比图

Fig.5 Fluorescence comparison of bacteria solution in the free group (BL21-N/C) and scaffold group (BL21-EN/KC) under ultraviolet light

2.2 EE、KK 自组装支架用于 D-塔格糖合成

基于 EE、KK 支架的胞内表征实验结果,进一步考察其在胞内组装氧化还原途径双酶合成 D-塔格糖的能力。以大肠杆菌 *E. coli* BL21 为出发菌株,选取 *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 来源的木糖还原酶 (SsXR) 以及 *Rhizobium leguminosarum* 来源的半乳糖醇脱氢酶 (R/GDH) 催化 D-半乳糖合成 D-塔格糖。以构建的重组质粒 pCDF-SsXR 与 pET-R/GDH,进而构建游离酶菌株 BL21-X/G, SDS-PAGE 结果显示 SsXR (35.9 ku) 与 R/GDH (27.3 ku) 成功表达 (图 6,泳道 1)。分别将 EE、KK 使用 GSlinker (GGGGSGGGGS) 连接至 SsXR 与 R/GDH 的 N 端,构建重组质粒 pCDF-EE-SsXR 与 pET-KK-R/GDH,进而构建支架级联型菌株 BL21-EX/KG, SDS-PAGE 结果显示 EE-SsXR (56.0 ku) 与 KK-R/GDH (47.3 ku) 成功表达 (图 6,泳道 2)。

在含有 10 g/L 乳糖的 LB 培养基中,重组菌株 BL21-X/G 与 BL21-EX/KG 培养至 OD₆₀₀ 为 0.50~0.60 时,发酵温度由 37 °C 调至 25 °C,加入 0.25 mmol/L IPTG 进行诱导。发酵 48 h, EE-KK 支架级联体系 (BL21-EX/KG) 的 D-塔格糖产量达到 3.52 g/L,相

比于游离体系 (BL21-X/G) 提高 50% (图 7)。结果说明,基于 EE/KK 的蛋白支架可以有效级联胞内目标酶,强化催化效率。据此推测,EE-KK 蛋白支架可能通过拉近 SsXR 与 R/GDH 酶之间的距离,产生类似“底物通道”效应^[16],此外, SsXR 与 R/GDH 催化所需的辅酶 (NAD(P)H/NAD(P)⁺) 之间也可以快速循环,进而提高 D-塔格糖的合成效率。

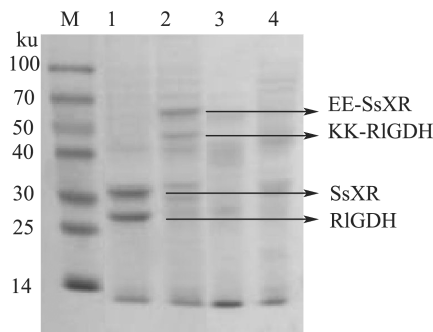


图6 *E. coli* BL21-X/G 与 *E. coli* BL21-EX/KG 中蛋白表达 SDS-PAGE

Fig.6 SDS-PAGE of protein expression in *E. coli* BL21-X/G and *E. coli* BL21-EX/KG

注: M:Marker; 泳道 1:*E. coli*BL21-X/G; 泳道 2:*E. coli* BL21-EX/KG; 泳道 3:*E. coli*BL21-pCDFDuet; 泳道 4:*E. coli* BL21-pETDuet。

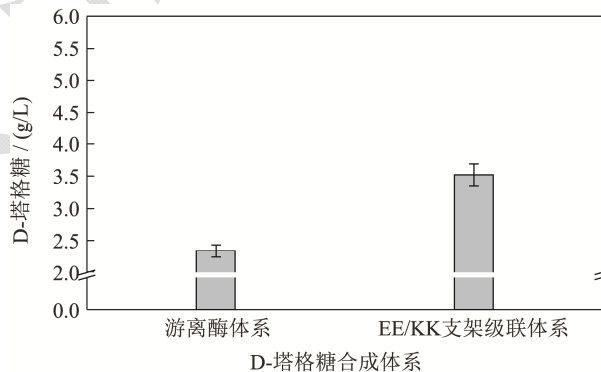


图7 游离酶体系与 EE-KK 支架级联体系合成 D-塔格糖产量比较

Fig.7 Comparison of the titer of D-tagatose synthesis by free enzyme system and EE/KK scaffold cascade system

2.3 摇瓶发酵条件优化

进一步地,通过优化发酵培养基种类、发酵温度、IPTG 添加量,以期 BL21-EX/KG 在摇瓶发酵合成 D-塔格糖的产量得到进一步提升。

2.3.1 发酵培养基种类优化

结果如图 8 所示,发酵 48 h, M9 培养基中菌株生物量 (OD₆₀₀ 为 8.12) 与 D-塔格糖产量最低 (1.07 g/L),这可能因为 M9 培养基成分简单,有机氮源较为缺乏,影响菌体的生长以及蛋白的表达^[28]。而利用 TB 培养基和 LB 培养基,48 h 菌株生物量分别达到 12.30 和

11.10. 虽然 TB 培养基略高于 LB 培养基, 但是 TB 培养基中 D-塔格糖的产量却显著低于 LB 培养基 (1.85 g/L VS 3.52 g/L)。猜测是因为 TB 培养基中含有甘油, 由于甘油的摄入与代谢会提高大肠杆菌胞内 NADH 的含量, 消耗 NAD⁺[29], 而 R/GDH 在催化半乳糖醇合成 D-塔格糖的同时也会消耗 NAD⁺合成 NADH, 因此, 甘油的添加可能会导致 NAD⁺的供给不足, 进而影响 D-塔格糖的合成。

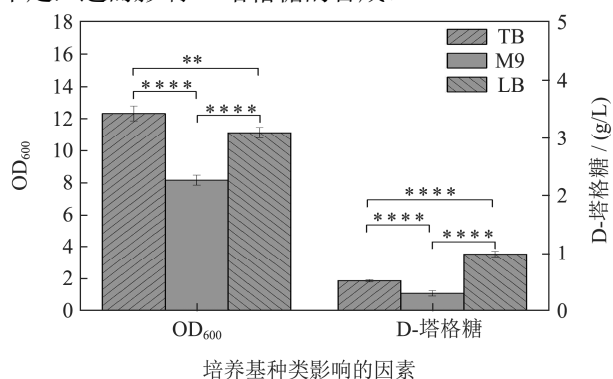


图 8 发酵培养基种类对 D-塔格糖合成的影响

Fig.8 Effect of medium type on D-tagatose synthesis

注: n.s 无显著性差异 ($P>0.05$), *差异显著 ($P<0.05$), **差异非常显著 ($P<0.01$), ****差异极显著 ($P<0.0001$)。

为了进一步验证我们的猜测, 在 LB 培养基中分别添加 10 g/L 甘油、10 g/L 葡萄糖以及微量元素, 考察对 BL21-EX/KG 合成 D-塔格糖的影响。结果如图 9 所示, 微量元素的添加对 D-塔格糖的合成具有一定的积极影响, 产量略有提高。葡萄糖的添加使得 D-塔格糖产量降低 56%, 这归结于大肠杆菌中存在的“葡萄糖效应”, 影响乳糖的转运和代谢^[30]。而甘油的添加也降低了 37%的 D-塔格糖产量, 这与在利用 TB 培养基发酵合成过程中的现象一致, 证实了我们的猜测, LB 培养基中, 甘油的添加会影响 D-塔格糖的合成。因此, 后续的摇瓶发酵培养基选用 LB 培养基。

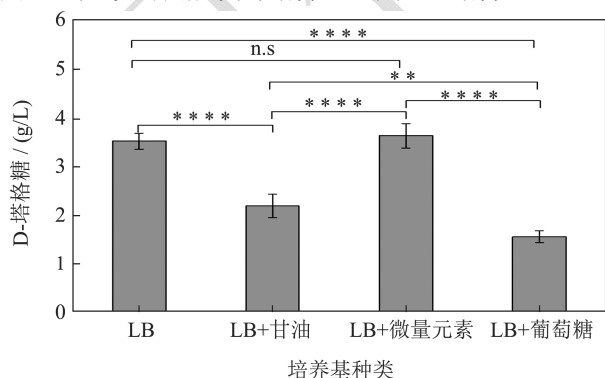


图 9 LB 发酵培养基中添加甘油、葡萄糖以及微量元素对 D-塔格糖合成的影响

Fig.9 Effects of adding glycerol, glucose and trace elements in LB fermentation medium on the synthesis of D-tagatose

2.3.2 发酵温度与诱导剂添加量优化

温度和 IPTG 浓度是影响外源蛋白表达的重要因素, 此外发酵温度也影响细胞生长代谢与产物的合成。我们在 LB 培养基中进一步考察了不同发酵温度和 IPTG 添加量对合成 D-塔格糖的影响。

首先考察了温度对 D-塔格糖合成的影响。图 10 所示, 菌体生物量随着发酵温度的升高而增加, 30 °C 与 37 °C 时菌体生长速率较快, 在 16 °C 下则相反。不同的是, D-塔格糖的产量与温度呈负相关。在 20 °C 下, D-塔格糖产量最高, 达到 3.82 g/L。可能是较高的温度影响蛋白的表达, 易形成包涵体。因此, 综合考虑, 后续选择 20 °C 为 D-塔格糖合成的发酵温度。

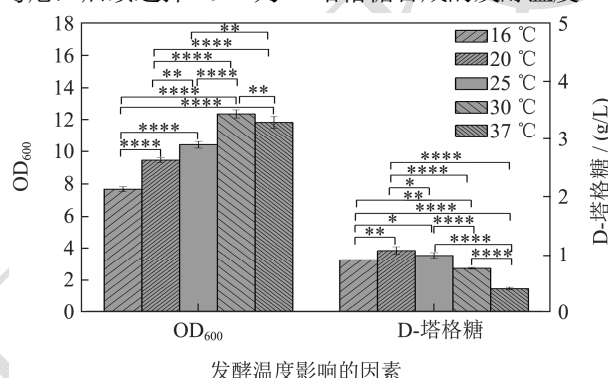


图 10 不同发酵温度对 D-塔格糖合成的影响

Fig.10 Effects of different fermentation temperatures on the synthesis of D-Tagatose

除温度之外, IPTG 添加量对蛋白的表达也同样重要。我们进一步比较了不同 IPTG 浓度 (0.1、0.25、0.5 和 1.0 mmol/L) 对 D-塔格糖合成的影响。结果如图 11 所示, 随着 IPTG 浓度的升高反而导致 D-塔格糖产量的降低。这与 Couto 等^[31]研究结果一致, 较高的 IPTG 浓度不会导致效价提高反而会造造成代谢负荷从而影响生产力。0.1 和 0.25 mmol/L 的添加量下, D-塔格糖的产量无显著性差异。因此, 选择 0.1 mmol/L 作为后续实验的 IPTG 添加量。

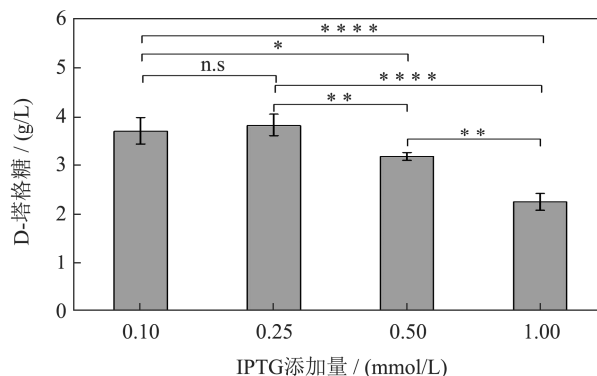


图 11 不同 IPTG 浓度对 D-塔格糖合成的影响

Fig.11 Effects of different IPTG concentrations on the synthesis of D-Tagatose

2.3.3 最适摇瓶发酵条件下菌株 BL21-EX/KG 合成 D-塔格糖

基于上述优化条件,在摇瓶中考察菌株 BL21-EX/KG 批次发酵合成 D-塔格糖的能力,结果如图 12 所示。发酵 48 h 后,菌体到达稳定期,OD₆₀₀ 为 11.50。D-塔格糖的产量持续增长,到 60 h 时到达峰值 3.93 g/L,此时乳糖几乎完全消耗,D-塔格糖对乳糖的转化率达到 0.39 g/g,为理论转化率(0.53 g/g)的 74%。Zhang 等^[32]通过肽接头(GGGGS)₃ 偶联 β-D-半乳糖苷酶和 L-阿拉伯糖异构酶实现从乳糖产 D-塔格糖,转化率为 42.40%。Zhang 等^[33]在半乳糖激酶基因失活的植物乳杆菌中过表达 β-半乳糖苷酶和 L-阿拉伯糖异构酶,实现 33%的乳糖转化率。可知,本实验构建的菌株可实现较高的乳糖转化率。然而乳糖消耗速率较慢,从而导致较低的 D-塔格糖生产强度[0.07 g/(L·h)]。猜测可能与摇瓶中较低的生物量有关。此外,大肠杆菌通过乳糖透性酶转运乳糖,转运效率较低。因此,后续实验可以结合高密度发酵以及细胞透性化^[34]提高 D-塔格糖的生产强度。

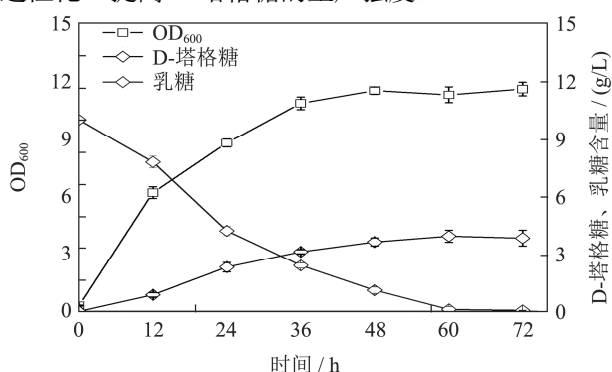


图 12 BL21-EX/KG 摇瓶发酵合成 D-塔格糖过程

Fig.12 D-Tagatose production from fermentation by BL21-EX/KG

3 结论

本研究首先验证了 EE-KK 单体在胞外和胞内均具有自组装能力。为进行概念验证,以大肠杆菌 BL21 为底盘细胞,通过与自组装蛋白支架 EE、KK 融合表达 SsXR、R/GDH,成功实现多酶级联催化乳糖合成 D-塔格糖。支架组 BL21-EX/KG 相较于游离组 BL21-X/G,塔格糖产量提高了 50%。进一步从发酵培养基种类、IPTG 添加量、发酵温度优化了发酵条件,得到最佳发酵条件为: LB 培养基,温度 20 °C, 0.1 mmol/L IPTG 添加量。以 10 g/L 乳糖为底物,摇瓶中 BL21-EX/KG 可实现 D-塔格糖产量达到 3.93 g/L,为理论转化率的 74%。本研究为基于氧化还原酶途径生物合成 D-塔格糖提供了研究基础,为多酶

级联组装提供了有效的工具。

参考文献

- [1] Guerrero-Wyss M, S D Agüero, L A Dávila. D-Tagatose is a promising sweetener to control glycaemia: A new functional food [J]. Bio Med Research International, 2018, 2: 1-7.
- [2] Donner T W, Wilber J F, Ostrowski D. D-tagatose, a novel hexose: Acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes [J]. Diabetes, Obesity and Metabolism, 1999, 1(5): 285-291.
- [3] Liang Yuxuan, Wen Peng, Wang Yu, et al. The constipation-relieving property of D-Tagatose by modulating the composition of gut microbiota [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(22): 5721.
- [4] Paterna J C, Boess F, Stäubli A, et al. Antioxidant and cytoprotective properties of D-tagatose in cultured murine hepatocytes [J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 1998, 148(1): 117-125.
- [5] 信成夫,景文利,于丽,等.化学异构法生产塔格糖的研究[J].中国食品添加剂, 2013, S1: 89-92.
- [6] Xu Zheng, Li Sha, Feng Xiaohai, et al. L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(21): 8869-8878.
- [7] Ravikumar Y, Ponpandian L N, Zhang Guoyan, et al. Harnesing L-arabinose isomerase for biological production of D-tagatose: Recent advances and its applications [J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 107: 16-30.
- [8] Muniruzzaman S, Tokunaga H, Izumori K. Isolation of *Enterobacter agglomerans* strain 221e from soil, a potent d-tagatose producer from galactitol [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 78(2): 145-148.
- [9] Su Wenbin, Li Feilong, Li Xueyong, et al. Using galactitol dehydrogenase coupled with water-forming NADH oxidase for efficient enzymatic synthesis of L-Tagatose [J]. New Biotechnology, 2021, 62(3): 18-25.
- [10] Zheng Zhaojuan, Xie Jiachao, Liu Peng, et al. Elegant and efficient biotransformation for dual production of D-Tagatose and bioethanol from cheese whey powder [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(3): 829-835.
- [11] Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahn H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 3(64): 333-339.

- [12] Klermund L, Poschenrieder S T, Castiglione K. Biocatalysis in polymersomes: improving multienzyme cascades with incompatible reaction steps by compartmentalization [J]. ACS Catalysis, 2017, 7(6): 3900-3904.
- [13] Li Chao, Wu Mian, Gao Xin, et al. Efficient biosynthesis of 2'-Fucosyllactose using an *in vitro* multienzyme cascade [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(39): 10763-10771.
- [14] Zhou Cailian, Feng Jiao, Wang Jing, et al. Design of an *in vitro* multienzyme cascade system for the biosynthesis of nicotinamide mononucleotide [J]. Catalysis Science & Technology, 2022, 12(4): 1080-1091.
- [15] Mahour R, Marichal-gallardo P A, Rexer T F T, et al. Multi-enzyme cascades for the *in vitro* synthesis of guanosine diphosphate L-fucose [J]. Chem Cat Chem, 2021, 13(8): 1981-1989.
- [16] Wheeldon I, Minter S D, Banta S, et al. Substrate channelling as an approach to cascade reactions [J]. Nature Chemistry, 2016, 8(4): 299-309.
- [17] Vázquez-gonzález M, Wang Chen, Willenr I. Biocatalytic cascades operating on macromolecular scaffolds and in confined environments [J]. Nature Catalysis, 2020, 3(3): 256-273.
- [18] Dubey N C, Tripathi B P. Nature inspired multienzyme immobilization: strategies and concepts [J]. ACS Applied Bio Materials, 2021, 4(18): 1077-1114.
- [19] 刘松. 构建辅酶自循环系统全细胞催化环氧化物合成 1,2-氨基醇类化合物[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [20] Liu Zhenjun, Cao Sheng, Liu Miao, et al. Self-assembled multienzyme nanostructures on synthetic protein scaffolds [J]. ACS Nano, 2019, 13(10): 11343-11352.
- [21] Wei Cuihua, Zhou Juan, Liu Tiangang, et al. Self-assembled enzymatic nanowires with a "Dry and Wet" interface improve the catalytic performance of januvia transaminase in organic solvents [J]. ACS Catalysis, 2021, 12(1): 372-382.
- [22] Chen Xiaohan, Chen Xinyi, Zhu Liying, et al. Programming an orthogonal self-assembling protein cascade based on reactive peptide-protein pairs for *in vitro* enzymatic trehalose production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(15): 4690-4700.
- [23] Lim S, Jung G A, Glover D J, et al. Enhanced enzyme activity through scaffolding on customizable self-assembling protein filaments [J]. Small, 2019, 15(20): 1970104.
- [24] Glover D J, Lim S, Xu Dawei, et al. Assembly of multicomponent protein filaments using engineered subunit interfaces [J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(10): 2447-2456.
- [25] Arpino J A J, Polizzi K M. A modular method for directing protein self-assembly [J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(5): 993-1002.
- [26] Lau Yuheng, Giessen T W, Altenburg W J, et al. Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote [J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 1311-1317.
- [27] Kim S, Hahn J S. Synthetic scaffold based on a cohesin-dockerin interaction for improved production of 2,3-butanediol in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biotechnology, 2014, 192(1): 92-96.
- [28] 杨杰, 张筠, 孟祥晨. 重组蛋白 LuxS 诱导表达及纯化条件的优化[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 170-175.
- [29] Durmin G, Clomburg J, Yeates Z, et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 103(1): 148-161.
- [30] Kimata K, Takahashi H, Inada T, et al. cAMP receptor protein-cAMP plays a crucial role in glucose-lactose diauxie by activating the major glucose transporter gene in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(24): 12914-12919.
- [31] Couto M R, Rodrigues J L, Rodrigues, L R. Optimization of fermentation conditions for the production of curcumin by engineered *Escherichia coli* [J]. Journal of The Royal Society Interface, 2017, 14(133): 20170470.
- [32] Zhang Susu, Xu Zhenshang, Ma Ming, et al. A novel *Lactococcus lactis* L-arabinose isomerase for D-tagatose production from lactose [J]. Food Bioscience, 2022, 48: 101765.
- [33] Zhang Susu, Guo Tingting, Xin Yongping, et al. Biotechnological production of D-tagatose from lactose using metabolically engineering *Lactiplantibacillus plantarum* [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 142: 110995.
- [34] 刘晓华, 李海星, 陈燕, 等. 透性化细胞制备方法的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2011, 11: 475-479.