

高效转化大豆低聚糖的果聚糖蔗糖酶的挖掘、表征及表达

汪斌^{1,2,3}, 应静茹^{1,2,3}, 陈媛媛^{1,2,3}, 方泽民^{1,2,3}, 肖亚中^{1,2,3}, 房伟^{1,2,3*}, 姚动邦^{1,2,3*}

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230000

2 生物催化与现代生物制造安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230601

3 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230601

汪斌, 应静茹, 陈媛媛, 方泽民, 肖亚中, 房伟, 姚动邦. 高效转化大豆低聚糖的果聚糖蔗糖酶的挖掘、表征及表达[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 333-351.

WANG Bin, YING Jingru, CHEN Yuanyuan, FANG Zemin, XIAO Yazhong, FANG Wei, YAO Dongbang. Mining, characterization, and expression of a fructan sucrose for efficient conversion of soybean oligosaccharides[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 333-351.

摘要: 大豆低聚糖因含大量蔗糖和棉子糖影响了其益生元价值。果聚糖蔗糖酶可催化蔗糖和棉子糖生成高附加值的低聚果糖和蜜二糖等组分。为获得高效转化大豆低聚糖的果聚糖蔗糖酶, 本研究首先从我国西沙群岛及渤海湾沿海区域微生物中挖掘果聚糖蔗糖酶基因, 然后对其进行酶学性质和催化性能表征, 最后将其在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中进行重组胞外表达。结果显示, 从耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)中挖掘出的新型果聚糖蔗糖酶 BhLS 39, 其以蔗糖和棉子糖为底物时的最适温度分别为 50 °C 和 55 °C, 最适 pH 值均为 5.5, K_{cat}/K_m 分别为 3.4 和 6.6 L/(mmol·s)。5 U 酶处理 400 g/L 棉子糖 30 min 后获得的蜜二糖转化率为 84.6%, BhLS 39 催化蔗糖可生成左聚型低聚果糖和果聚糖。本研究实现了 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达, 并通过共表达胞内伴侣蛋白 DnaK 和胞外伴侣蛋白 PrsA 使其重组胞外活性提高到 17 U/mL, 是对照菌的 5.2 倍。本研究挖掘出的 BhLS 39 有利于大豆低聚糖的提质增效, 也可促进其他重组蛋白在枯草芽孢杆菌中实现高效重组表达。

关键词: 大豆低聚糖; 左聚糖蔗糖酶; 枯草芽孢杆菌; 伴侣蛋白; 胞外表达

资助项目: 国家自然科学基金(32302017); 国家重点研发计划(2022YFC2805102); 安徽大学博士科研启动基金(S020318003/006)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32302017), the National Key Research and Development Program (2022YFC2805102), and the Doctoral Research Start-up Funding of Anhui University (S020318003/006).

*Corresponding authors. E-mail: YAO Dongbang, dbyaoanhui@ahu.edu.cn; FANG Wei, 03046@ahu.edu.cn

Received: 2024-04-29; Accepted: 2024-06-07; Published online: 2024-06-11

Mining, characterization, and expression of a fructan sucrose for efficient conversion of soybean oligosaccharides

WANG Bin^{1,2,3}, YING Jingru^{1,2,3}, CHEN Yuanyuan^{1,2,3}, FANG Zemin^{1,2,3}, XIAO Yazhong^{1,2,3}, FANG Wei^{1,2,3*}, YAO Dongbang^{1,2,3*}

1 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230000, Anhui, China

2 Anhui Key Laboratory of Biocatalysis and Modern Biomanufacturing, Hefei 230601, Anhui, China

3 Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230601, Anhui, China

Abstract: The high content of sucrose and raffinose reduces the prebiotic value of soybean oligosaccharides. Fructan sucrases can catalyze the conversion of sucrose and raffinose to high-value products such as fructooligosaccharides and melibiose. To obtain a fructan sucrose that can efficiently convert soybean oligosaccharides, we first mined the fructan sucrose gene from microorganisms in the coastal areas of Xisha Islands and Bohai Bay and then characterized the enzymatic and catalytic properties of the enzyme. Finally, recombinant extracellular expression of this gene was carried out in *Bacillus subtilis*. The results showed that a novel fructan sucrose, BhLS 39, was mined from *Bacillus halotolerans*. With sucrose and raffinose as substrates, BhLS 39 showed the optimal temperatures of 50 °C and 55 °C, optimal pH 5.5 for both, and K_{cat}/K_m ratio of 3.4 and 6.6 L/(mmol·s), respectively. When 400 g/L raffinose was used as the substrate, the melibiose conversion rate was 84.6% after 30 min treatment with 5 U BhLS 39. Furthermore, BhLS 39 catalyzed the conversion of sucrose to produce levan-type-fructooligosaccharide and levan. Then, the recombinant extracellular expression of BhLS 39 in *B. subtilis* was achieved. The co-expression of the intracellular chaperone DnaK and the extracellular chaperone PrsA increased the extracellular activity of the recombinant BhLS 39 by 5.2 folds to 17 U/mL compared with that of the control strain. BhLS 39 obtained in this study is conducive to improving the quality and economic benefits of soybean oligosaccharides. At the same time, the strategy used here to enhance the extracellular expression of BhLS 39 will also promote the efficient recombinant expression of other proteins in *B. subtilis*.

Keywords: soybean oligosaccharides; levansucrase; *Bacillus subtilis*; chaperonin; extracellular expression

大豆低聚糖是大豆中可溶性寡糖的总称，具有增强机体免疫、降血压和防便秘等功能^[1]，受到研究人员广泛关注。然而，由于大豆低聚糖中存在棉子糖，其进入动物机体后会被肠道内的厌氧微生物发酵，导致肠胀气和腹痛等不良症状^[2]。另外，大豆低聚糖中的蔗糖含量较高(约为 45%)^[3]，严重限制了其在减肥食品和糖

尿病人专用食品中的应用。利用果聚糖蔗糖酶将棉子糖和蔗糖生成高益生元的蜜二糖和低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS)等组分可有效解决上述问题^[4-5]。其中，蜜二糖可促进人体肠道对钙的吸收，FOS 能够刺激有益结肠乳酸菌的生长并增强肠道免疫反应。因此，利用果聚糖蔗糖酶转化大豆低聚糖中的蔗糖和棉子

糖,对大豆低聚糖的提质增效具有重要意义。

果聚糖蔗糖酶(fructan sucrase)属于糖苷水解酶 GH68 家族,可催化水解、聚合和转果糖基这 3 种反应类型^[6]。果聚糖蔗糖酶以蔗糖为底物,可生成 β -(2,6)和 β -(2,1)型低聚果糖和果聚糖,即左聚糖型和菊糖型^[7]。其中,与菊糖型果糖聚合物相比,左聚糖型果糖聚合物因具有抗肿瘤和抗糖尿病等优点,益生元价值更高^[8]。相应地,可将果聚糖蔗糖酶分为左聚糖蔗糖酶(levansucrase)和菊糖蔗糖酶(inulosucrase)^[9]。果聚糖蔗糖酶的来源广泛,其中,天然微生物宿主主要包括解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[10]、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[11]和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)^[12]等。目前,果聚糖蔗糖酶主要应用于以蔗糖为底物进行的 FOS 的生产^[13]。然而,关于果聚糖蔗糖酶在大豆低聚糖中的酶催化应用尚未见报道,究其原因缺乏可同时高效水解蔗糖和棉子糖的果聚糖蔗糖酶优良酶资源,而且生产水平低。

重组表达是大量获得目的蛋白的有效方式。枯草芽孢杆菌是公认的食品安全菌,因其具有蛋白合成与分泌能力强、易培养及遗传背景清楚等优点,已被广泛用于食品酶的表达制备^[14]。在前期研究中,孙惟沁等^[15]通过优化启动子和发酵条件,将来源于肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的果聚糖蔗糖酶 LEME 在枯草芽孢杆菌中的胞外活性提高了 25.9 倍,达到 108.34 U/mL,是目前已知的最高水平。除启动子和发酵条件外,胞内蛋白前体中的信号肽、宿主菌胞外蛋白酶以及胞内外的伴侣蛋白等也是影响靶蛋白在枯草芽孢杆菌中重组表达水平的重要因素^[16-18]。枯草芽孢杆菌中目前已报道的胞内伴侣蛋白主要包括 DnaK-DnaJ-GrpE 和 GroES-GroEL 这 2 种复合物,胞外伴侣蛋白主要是附着在细胞膜胞质外侧的

PrsA^[19]。Yao 等^[20]通过过表达胞内伴侣蛋白显著减少了重组菌 WHS11YSA 胞内包涵体的形成,并将 α -淀粉酶在枯草芽孢杆菌中的胞外重组活性提高了 7.1 倍,达到了 1 496.8 U/mL。

为解决果聚糖蔗糖酶优良酶资源匮乏以及其生产水平低的问题,本研究首先挖掘具有优良催化性能的果聚糖蔗糖酶,并经大肠杆菌重组表达后,以蔗糖和棉子糖为底物研究其酶学性质和催化性能。然后,将获得的果聚糖蔗糖酶在枯草芽孢杆菌中进行重组胞外表达,并通过共表达伴侣蛋白以提高果聚糖蔗糖酶的重组表达水平。本研究的开展不仅有助于大豆低聚糖的提质增效,同时也为提高其他蛋白在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达水平提供了策略参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21(DE3)和 Trans1-T1,枯草芽孢杆菌 168 以及 pBE-S、pBHSS 及 pET-28a(+)载体均为本实验室前期构建和保藏。

1.1.2 酶和试剂

质粒小量制备试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、基因组抽提试剂盒和 BCA 试剂盒均购于生工生物工程有限公司;抗生素购于上海 BBI 有限公司;限制性核酸内切酶与 DNA 聚合酶分别购于 TaKaRa 公司和全式金公司;其他常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基及溶液

筛选培养基(1.5 L): 15 g 蔗糖, 15 g Na₂HPO₄·7H₂O, 1.5 g NH₄Cl, 0.75 g NaCl, 4.5 g KH₂PO₄, 22.5 g 琼脂, 1.875 g 丙酮酸钠。人工海水(0.5 L): 15 g 人工海盐。T-base 溶液(1.5 L): 9 g KH₂PO₄, 1.5 g 柠檬酸三钠二水合物 27.45 g

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3 g $(NH_4)_2SO_4$ 。其余培养基及溶液均参考《分子实验克隆指南》^[21]。

1.2 方法

1.2.1 产酶菌株的筛选及鉴定

采集的样品具体信息见表 1。获得样品后用冰袋运回实验室,放置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保藏备用。称取 2 g 样品与 18 mL 无菌海水混合后,用无菌去离子水梯度稀释至 10^{-6} 。将稀释液均匀地涂布在筛选板上,分别于 16、28、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育 6 d,定期观察平板上菌落的生长状态。挑取板上的菌落到含 LB 培养基的 96 深孔板中,于同一条件下培养 24 h。然后离心取上清,以蔗糖为底物测上清液酶活性。再将高活性样品以棉子糖为底物进行酶促反应,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测反应液成分。在此基础上,筛选可高效将棉子糖水解成蜜二糖的菌株。通过抽提目标菌株的基因组 DNA,以其为模板进行 16S rRNA 扩增。在此基础上,通过序列比对获得菌株 16S rRNA 的同源性信息,确定目标菌株的种属。

1.2.2 菌株的 16S rRNA 鉴定

采用基因组抽提试剂盒抽提基因组后,利用引物 F1/R1 进行 PCR 扩增获得 16S rRNA 基

因,引物见表 2。使用 TA 克隆法,将 pEASY-T3 克隆载体与 16S rRNA 基因片段进行连接,再通过化学转化法转化至 *E. coli* Trans1-T1 中,获得的阳性克隆抽提质粒后送上海生物生工公司进行测序分析。

1.2.3 果聚糖蔗糖酶重组表达载体的构建

基于 16S rRNA 的测序结果,从 NCBI 中检索与筛选菌株具有较高相似度的菌株。在此基础上,基于上述菌株的基因组基因功能注释,选取其中的果聚糖蔗糖酶基因,并经 BLAST 比对分析,设计通用引物 F2/R2 进行 PCR 扩增目的基因。然后,利用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中分别对目的基因和 pET-28a(+) 载体处理 1.5 h。经胶回收后,将获得的目的基因和 pET-28a(+) 载体片段进行连接转化,获得用于在大肠杆菌中重组表达的表达载体。

以耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) 2M-39 基因组为模板,使用引物 F3/R3 扩增 *bhLS* 39 片段;以质粒 pBHSS 为模板,使用引物 F4/R4 扩增线性化载体片段 C13-1;通过长时间重叠延伸 PCR (prolonged overlap extension PCR, POE-PCR) 将获得的 *bhLS* 39 片段和 C13-1 片段进行连接,构建 *BhLS* 39 在枯草芽孢杆菌中的重组表达载体 pBHSS1 (图 1A)。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

Collection site	Sample type	Water temperature/salinity	pH	Longitude (E)	Latitude (N)
Yongxing island intertidal zone	Sediment	$34\text{ }^\circ\text{C}$	8.1	112.3°	16.8°
Yongxing island land	Sediment	$35\text{ }^\circ\text{C}$	8.1	112.3°	16.8°
Shidao intertidal zone	Sediment	$30\text{ }^\circ\text{C}$	8.0	$112^\circ20'50''$	$16^\circ50'41''$
Dalian Amber bay	Rocky beach	31.3%	8.2	$121^\circ41'21.25''$	$38^\circ52'0.97''$
Wafangdian xihaxing resort	Beach	8.1%	8.1	$121^\circ54'39.29''$	$40^\circ3'37.47''$
Zhuanghe Clam island	Beach and mudflat	24.2%	8.3	$123^\circ2'2.66''$	$39^\circ38'37.7''$
Dandong Donggang	Mud flat	18.2%	7.4	$124^\circ32'0.31''$	$39^\circ49'0.9''$
Yingkou Beihai red beach	Rock beach and mudflat	22.9%	8.1	$122^\circ13'40.27''$	$40^\circ25'14.8''$
Liaohe Lipstick beach	Mudflat	2.4%	8.1	$121^\circ46'39.11''$	$40^\circ53'55.3''$

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Purpose
F1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA amplification
R1	GGTTACCTTGTTACGACTT	
F2	GGGAATCCATATGTATAACGAAGGGGTCACTA	<i>bhLS</i> 39 amplification
R2	CCGCTCGAGCTATGCTGATGGAAGTGTGGT	
F3	TAGTGATGGTGATGGTGATGTTTGTTAATTGTTAATTGTCCTT	<i>bhLS</i> 39 amplification
R3	ACATCAGCCGTAGGATCCATGAACATCAAAAAGTTTGC	
F4	AAGGACAATTAACAATTAACAAACATCACCATCACCATCACTA	C13-1 linearized vector
R4	GCAAACCTTTTTGATGTTTCATGGATCCTACGGCTGATGT	fragment amplification
F5	ACTAGTGTTCTTTTCTGTATGAAAATAGTTATTTTCG	Promoter P_{aprE} amplification
R5	ACGCGTCCCTCTCCTTTTGTCTAAGTTC	
F6	TGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGC	Terminator Ter-1 amplification
R6	CACTTCAACGCACCTTTCAGCTTACTTGGAAGTGGTTGCCG	
F7	CTTAAGCAAAGGAGAGGGACGCGTATGAAGAAAATCGCAATAGCAG	<i>prsA</i> amplification
R7	GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTATTTAGAATTGCTTGAAGAT GAAGAAG	
F8	CTTAAGCAAAGGAGAGGGACGCGTATGTTAAAGCCATTAGGTGATCG CGTTG	<i>groESL</i> amplification
R8	GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTACATCATTCCACCCATACCGC CCATG	
F9	CTTAAGCAAAGGAGAGGGACGCGTATGAGTAAAGTTATCGGAATCGAC	<i>dnaK</i> amplification
R9	GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTATTTTTGTTTTGGTCGTCG	
F10	TCCGGCAACCACTTCCAAGTAAGCTGAAAGGTGCGTTGAAGTGTG	C13-2 linearized vector
R10	TTCATACAGAAAAGAACTAGTCCTTCCACCCTTTCGATCAATTC	fragment amplification
F11	TGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTGAACCTTTTAAAT	Promoter P_{43} amplification
R11	GTGTACATTCCTCTCTTACCTATAATGGTACCGCTA	
F12	CTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG	Terminator Ter-2 amplification
R12	ACCAACACTTCAACGCACCTTTCAGCCAGATTACGCGCAGAAAAAAG GATCT	
F13	CATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGAAGAAAATCGCAATAGCA	<i>prsA</i> -2 amplification
R13	TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTATTTAGAATTGCTTGAAGATG	
F14	AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGGCTGAAAGGTGCGTTGAAGTGT TGGT	C13-3 linearized vector
R14	CAAGCGAAAACATACCACCTATCACCTTCCACCCTTTCGATCAATTCCA	fragment amplification
F15	TCTTCCGGCAACCACTTCCAAGTAATGATAGGTGGTATGTTTTCGCTTG AAC	Used with primer R13 for amplification of the P_{43} - <i>prsA</i> -2-Ter-2 fragment

以 pBE-S DNA 质粒为模板, 分别使用引物 F5/R5 和 F6/R6 扩增启动子 P_{aprE} 和终止子 Ter-1 片段。以 *B. subtilis* 168 基因组为模板, 分别使

用引物 F7/R7、F8/R8 和 F9/R9 扩增伴侣蛋白编码基因 *prsA*、*groESL* 和 *dnaK*。通过 Overlap-PCR 分别连接 P_{aprE} 、伴侣分子片段以及 Ter-1, 构成

串联片段。使用引物 F10/R10 从质粒 pBHSS1 中扩增线性化载体片段 C13-2。最后, 使用 POE-PCR 连接各个串联片段和线性化载体片段, 生成质粒 pBHSS1-*prsA*、pBHSS1-*dnaK* 和 pBHSS1-*groESL* (图 1B-1D)。

以质粒 pBHP 为模板, 分别通过引物 F11/R11 和 F12/R12 扩增启动子 P_{43} 和终止子 *Ter-2*。使用引物 F13/R13 从质粒 pBHSS1-*prsA* 中扩增目的片段 *prsA-2*。然后通过 Overlap-PCR 分别连接 P_{43} 、*prsA-2* 以及 *Ter-2*, 构成串联片段 P_{43} -*prsA-2*-*Ter-2*。用引物 F14/R14 从质粒 pBHSS1 中扩增 C13-3 载体片段。最后, 用 POE-PCR 连接串联片段和载体片段, 构建质粒 pBHSS1- P_{43} -*prsA*。

使用引物 F5/R6 分别从质粒 pBHSS1-*dnaK* 及 pBHSS1-*groESL* 中扩增片段 P_{aprE} -*dnaK*-*Ter-1* 及 P_{aprE} -*groESL*-*Ter-1*。使用引物 F15/R13 从质

粒 pBHSS1- P_{43} -*prsA* 中扩增片段 P_{43} -*prsA-2*-*Ter-2*。使用引物 F14/R10 从质粒 pBHSS1-*groESL* 中扩增线性化载体片段 C13-4。最后, 使用 POE-PCR 连接串联片段和线性化载体片段, 生成质粒 pBHSS1-*dnaK*-*prsA* 及 pBHSS1-*groESL*-*prsA* (图 1E、1F), 相关引物见表 2。

1.2.4 大肠杆菌的感受态制备及转化

大肠杆菌的感受态制备及转化方法具体参考文献[22]。

1.2.5 大肠杆菌的诱导表达与酶分离纯化

将含果聚糖蔗糖酶基因的重组表达载体转化到 *E. coli* BL21(DE3) 中构建相应的重组菌。其中, 以含 pET-28a(+) 空载质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 菌株作对照。在 16 °C、120 r/min 条件下, 利用 0.2 mmol/L IPTG 诱导表达 16 h。将发酵液进行离心后收集菌体沉淀, 通过加入柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液悬浮后进行超声破碎,

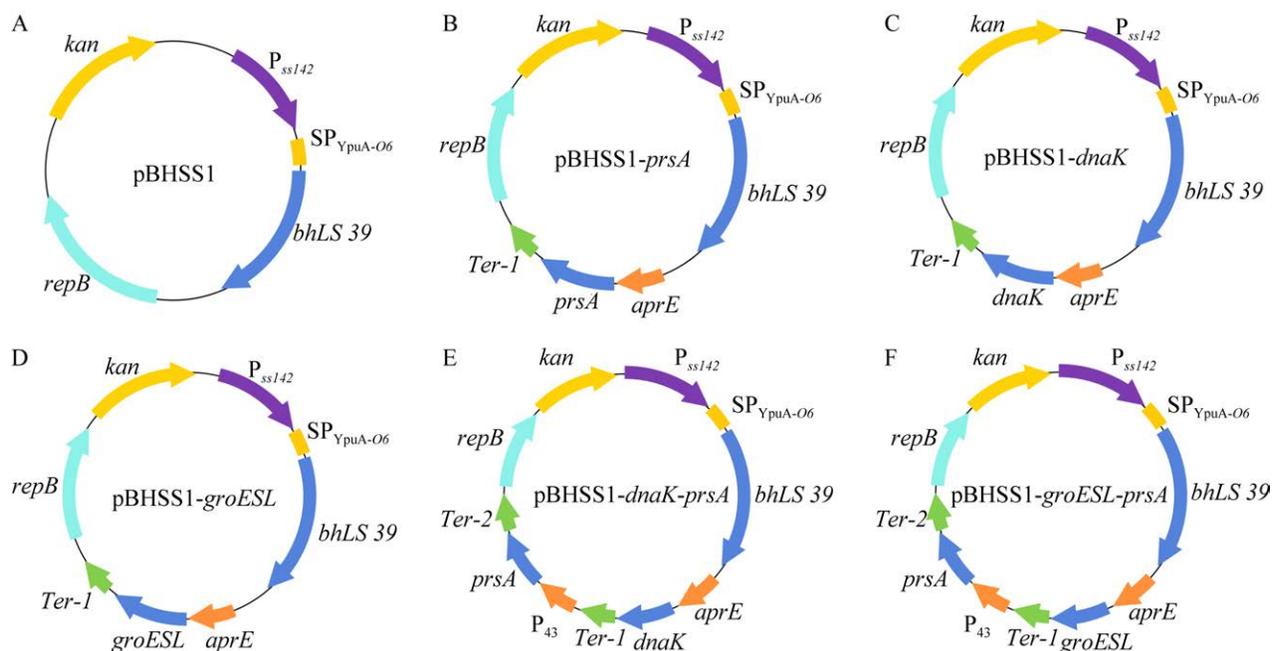


图 1 BhLS 39 的重组载体示意图

Figure 1 Schematic of recombinant vector for BhLS 39. A: pBHSS1; B: pBHSS1-*prsA*; C: pBHSS1-*dnaK*; D: pBHSS1-*groESL*; E: pBHSS1-*dnaK*-*prsA*; F: pBHSS1-*groESL*-*prsA*.

并收集破碎上清。用 3 CV 去离子水(CV 为柱体积)冲洗预装载柱。去离子水流出后,加入适量硫酸镍。硫酸镍流出后,加入 1 CV 的 1×Binding buffer 平衡柱子。将破碎上清加至平衡好的镍柱中,收集流出液。加入 1 CV 1×Binding buffer 冲洗预装载柱,流出后分别加入不同浓度的咪唑溶液洗脱,并收集洗脱液。利用 SDS-PAGE 检测分离的样品纯度,通过透析去除离子,再使用截留分子量为 10 kDa 的浓缩管进行样品浓缩。

1.2.6 酶学性质分析

以蔗糖为底物的果聚糖蔗糖酶活性测定:取 50 μL 粗酶液样品,加入到含 430 μL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L, pH 6.5)和 120 μL 蔗糖(终浓度为 2%)体系中,混匀后在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min。然后,加入 300 μL 的 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)终止反应,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 后在 540 nm 波长下测混合液的吸光值。酶活单位定义:在上述条件下,每 min 生成 1 μmol 葡萄糖所需的酶量即为 1 个酶活单位(U)。

以棉子糖为底物的果聚糖蔗糖酶活性测定:取 50 μL 粗酶液样品,加入到含 430 μL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L, pH 6.5)和 120 μL 棉子糖(终浓度为 3%)体系中,混匀后在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 10 min。然后,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 10 min 后灭活。将反应液经适当稀释后进行高效液相色谱(HPLC)检测产物蜜二糖的含量。酶活单位定义:在上述条件下,每 min 生成 1 μmol 蜜二糖所需的酶量即为 1 个酶活单位(U)。

最适 pH 的测定:于 35 $^{\circ}\text{C}$ 下分别检测在不同 pH 下(pH 3.0–8.0)的重组酶活性,以最高酶活为 100%,计算相对酶活。

pH 稳定性的测定:将酶液分别置于 pH 4.0、5.0、5.5、6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L)中于 35 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育不同时间后,测定重组酶的残余活力。以原酶液的酶活力为

100%,计算相对残留酶活。

最适温度的测定:于 pH 6.5 下分别检测不同温度下(30–70 $^{\circ}\text{C}$)的重组酶活性,以最高酶活为 100%,计算相对酶活。

温度稳定性的测定:分别于 35、40、45、50 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中孵育不同时间后,测定重组酶的残余活力。以原酶液的酶活为 100%,计算相对残余酶活。

动力学参数测定:参照 BCA 试剂盒的说明书,拟合 BCA 标准蛋白曲线并测定蛋白的含量。分别以蔗糖和棉子糖为底物测定重组酶的催化反应动力学参数。其中,酶活测定的温度为 50 $^{\circ}\text{C}$,底物分别为不同浓度的蔗糖(5–600 mmol/L)和棉子糖(5–600 mmol/L)。通过对数据进行拟合分析,得到 K_m 及 V_{max} 值。根据蛋白含量,计算催化常数 K_{cat} 及催化效率 K_{cat}/K_m 。

1.2.7 酶催化体系及方法

果聚糖蔗糖酶对棉子糖的酶催化体系及其优化:第一种反应体系,即在 1 mL 的反应体系中,加酶量为 2 U,缓冲液为 pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠,反应底物棉子糖浓度分别为 65、100、200、300 g/L。第二种反应体系,即在 1 mL 的反应体系中,加酶量 5 U,缓冲液为 pH 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠,对应底物棉子糖浓度分别为 65、100、200、300、400 g/L。分别基于上述 2 种反应体系,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 6 h 后离心取上清,经 0.22 μm 的膜过滤后用 HPLC 测定反应体系各个组分的含量。

果聚糖蔗糖酶对蔗糖的酶催化体系:在 500 mmol/L 蔗糖中加入 1.5 U 果聚糖蔗糖酶,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下反应相应的时间。反应结束后,在沸水浴中加热 15 min 使酶失活,将样品离心后取上清进行后续产物分析。

1.2.8 酶催化产物分析

薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)

分析:层析缸中提前加入配制好的展层剂(含有 1、4、9 mL 的水、氯仿和乙酸),待硅胶板点样后将点样孔端朝下放入层析缸中。结束后,将硅胶板浸入显色剂中,干燥后于 90 °C 烘箱中放置 15 min,从而使斑点显色。

液相色谱-质谱(learning content management system, LC-MS) 连用分析:将酶催化反应的样品煮沸离心后用 0.22 μm 滤膜过滤上清样品,然后进行 LC-MS 检测。其中,LC-MS 检测过程中以超纯水为流动相,设置 0.5 mL/min 的流速,采用 Hi-plex Ca 色谱柱,样品上样量为 10 μL ,采用负离子模式,离子源为电喷雾电离源(electrospray ionization source, ESI),检测范围为 50–2 000 m/z 。

HPLC 分析:将反应后的样品煮沸离心,经 0.22 μm 的滤膜过滤后进行检测。其中,HPLC 检测过程中流动相为超纯水,流速为 0.5 mL/min,色谱柱为 Hi-plex Ca,样品上样量为 20 μL ,使用的检测器为蒸发光检测器(evaporative light scattering detector, ELSD),蒸发器和雾化器温度分别为 90 °C 和 80 °C。

傅里叶红外光谱(fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)法分析产物多糖的结构,阐明转糖苷产物糖苷键的主要功能基团及其类型。取适量冷冻干燥后的反应液粉末,加入约 10 倍烘干的溴化钾,在研钵中混匀,磨成极细的粉末。制成薄片后于红外光谱仪中,在设定的波长范围内进行红外光谱扫描,输出并处理分析谱图。

核磁共振谱(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)分析主要是将反应后的样品用 Sevag 法除蛋白后干燥,溶解在氧化氘(D_2O)中(约 50 mg/mL),利用 NMR 光谱仪记录一维的碳谱(^{13}C -NMR)。

1.2.9 枯草芽孢杆菌感受态的制备与转化

枯草芽孢杆菌的感受态制备及转化方法具

体参考文献[23]。

1.2.10 枯草芽孢杆菌重组菌的摇瓶发酵

从-80 °C 冰箱取保藏的甘油管在 LB 平板上进行划线活化后,调单菌落在 Luria-Bertani(LB)液体培养基中于 37 °C 下培养 12 h 获得种子液。按照 2% 的接种量转接到 100 mL 的 Yeast-Tryptone (YT)培养基中,于 33 °C、200 r/min 下进行摇瓶培养。

2 结果与分析

2.1 产酶菌株的筛选及种属鉴定

为了筛选可高效转化大豆低聚糖的果聚糖蔗糖酶,分别从我国西沙群岛和渤海湾沿海区域随机选取 9 个样本进行后续研究。结果发现,经筛选后从上述样品中获得 68 株能水解蔗糖的菌株,它们分别属于芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、微小细菌属、不动细菌属以及普里斯特氏菌属(图 2)。根据菌株所在筛选样品的来源地进行分类统计后发现,上述菌株分别来源于辽河口红海滩(15 株)、庄河市蛤蜊岛(9 株)、营口北海红海滩(10 株)、丹东市东港(13 株)、瓦房店市西海兴度假村(3 株)、永兴岛潮间带(8 株)、大连市琥珀湾(2 株)、石岛潮间带(7 株)、永兴岛陆地(1 株)。另外,不同来源的样品中所含的菌株多样性存在明显的差异,这表明从合适的区域选取样品对后续筛选获得目标菌株具有重要意义(图 2)。

在上述筛选到的 68 株菌株中,对棉子糖具有较高水解活性的菌株为 2M-39,其具体信息见表 3。基于菌株 2M-39 的 16S rRNA 序列信息,在 NCBI 数据库中进行检索分析后发现,与其相似度最高的菌株为 *B. halotolerans*,两者 16S rRNA 序列间的相似性为 99.87%。经文献调查发现,目前尚未见关于 *B. halotolerans* 棉子糖转化酶的报道。

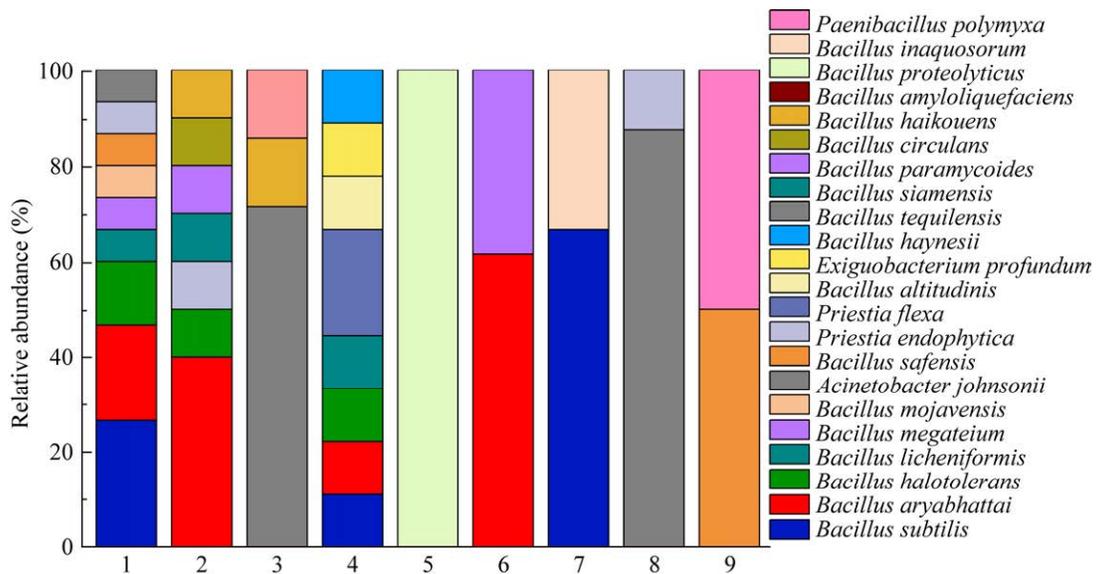


图2 产酶菌株的分布 1: 辽河口红海滩; 2: 营口市北海红海滩; 3: 石岛潮间带; 4: 庄河市蛤蜊岛; 5: 永兴岛陆地; 6: 丹东市东港; 7: 瓦房店市西海兴度假村; 8: 永兴岛潮间带; 9: 大连市琥珀湾。
Figure 2 Distribution of enzyme-producing strains. 1: Liaohe Lipstick beach; 2: Yingkou Beihai red beach; 3: Shidao intertidal zone; 4: Zhuanghe Clam island; 5: Yongxing island land; 6: Dandong Donggang; 7: Wafangdian Xihaixing resort; 8: Yongxing island intertidal zone; 9: Dalian Amber bay.

表3 菌株 2M-39 的来源及种属信息

Table 3 Strain 2M-39 source and species information

Number	Similar strain	Consistence	Temperature (°C)	Source	Types
2M-39	<i>Bacillus halotolerans</i>	99.87%	28	Yingkou Beihai red beach	Mud flat

2.2 果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 在 *E. coli* 中的重组表达、纯化及其酶学性质表征

2.2.1 果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 在 *E. coli* 中的重组表达及纯化

大肠杆菌因具有易培养、遗传操作简单和发酵周期短等优点, 是目前常用的工业微生物表达宿主之一。为探究 *B. halotolerans* 2M-39 中的果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 在高效转化大豆低聚糖中的应用价值, 本研究首先将其在大肠杆菌中进行重组表达, 并对获得的重组酶的酶学性质进行表征。将含有 *bhLS 39* 的重组表达载体 pET-28a-*BhLS 39* 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 获得重组菌 EYC39。经摇瓶发酵后, 对重

组菌 EYC39 的菌体破碎液上清和破碎沉淀样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 所示。其中, 重组菌 EYC39 的菌体破壁上清在 56 kDa 附近出现明显条带, 与 BhLS 39 理论分子量大小相符。进一步通过镍柱对重组菌的破碎上清进行纯化, 获得纯重组蛋白 BhLS 39 (图 3)。

2.2.2 果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 的酶学性质表征

分别以蔗糖和棉子糖为底物, 测定 BhLS 39 的最适 pH 和最适温度。结果表明, BhLS 39 以蔗糖和棉子糖为底物时的最适 pH 值均为 5.5 (图 4A), 最适温度分别为 50 °C 和 55 °C (图 4C)。由于大豆低聚糖中蔗糖含量较棉子糖高, 且

BhLS 39 基于两者的最适 pH 值相同且最适温度相近, 为方便后续研究, 仅基于蔗糖探究 BhLS 39 的 pH 和温度稳定性。结果表明, BhLS 39 在 pH 6.0 下的半衰期为 4 h (图 4B); BhLS 39 在 45 °C 下的半衰期为 30 min, 当温度低于 45 °C 时较为稳定(图 4D)。其中, 在 35 °C 和 40 °C 水中孵育 4 h 后酶活性仍在 55% 以上。

分别以蔗糖和棉子糖为底物, 测定了 BhLS 39 的动力学常数, 结果如表 4 所示。其中, BhLS 39 对棉子糖的 K_m 、 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 值分别是蔗糖的 2.2、4.3 和 1.9 倍。上述结果表明, BhLS 39 对棉子糖的亲合性低于蔗糖, 但对棉子糖的催化效率高于蔗糖。

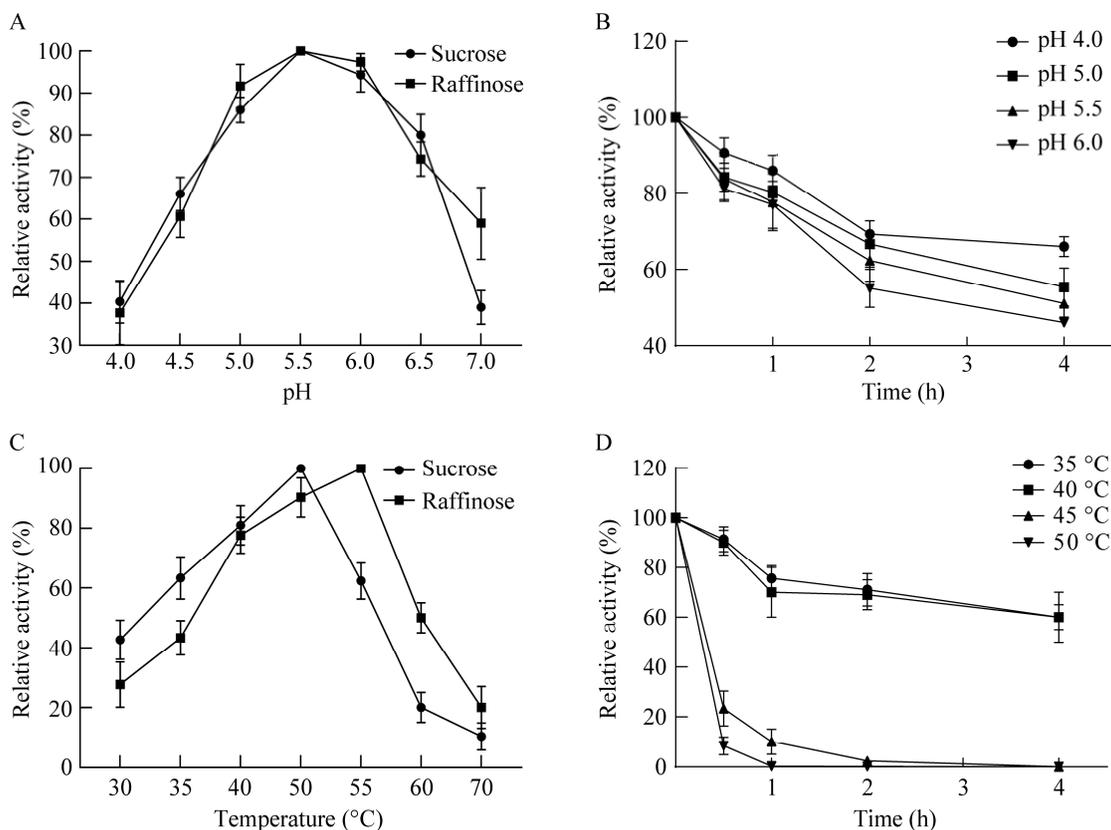


图 4 pH 和温度对 BhLS 39 活性及稳定性的影响 A: 最适 pH; B: pH 稳定性; C: 最适温度; D: 温度稳定性。

Figure 4 Effects of pH and temperature on the activity and stability of BhLS 39. A: The optimal pH; B: pH stability; C: The optimal temperature; D: Thermal stability.

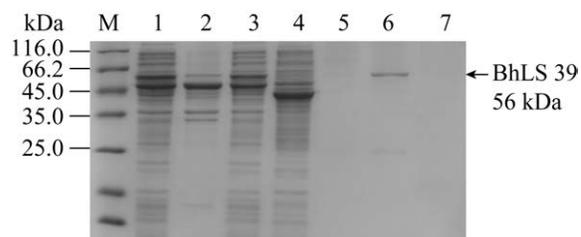


图 3 BhLS 39 的 SDS-PAGE 分析 M: Marker; 泳道 1-3 分别为菌体破碎上清、菌体破碎沉淀和蛋白穿透液; 泳道 4-7 分别为 30、50、200、1 000 mmol/L 咪唑。

Figure 3 SDS-PAGE analysis of BhLS 39. M: Marker; Lane 1: Cell lysate supernatants; Lane 2: Cell lysate precipitates; Lane 3: Protein penetrating solution; Lane 4-7: 30, 50, 200 and 1 000 mmol/L imidazole.

表 4 BhLS 39 的动力学参数

Table 4 Dynamic parameters of BhLS 39

Substrate	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$)	K_m (mmol/L)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m L/(mmol·s)
Sucrose	38.5	33.5	113.3	3.4
Raffinose	157.6	73.7	486.8	6.6

2.3 果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 的催化性能验证及产物表征

2.3.1 BhLS 39 对棉子糖的催化性能验证及产物表征

为探究 BhLS 39 转化棉子糖的能力, 分别从底物浓度、加酶量和反应时间的角度考察了 BhLS 39 对棉子糖的转化效果, 结果如图 5 所示。其中, 当加酶量为 2 U 时(图 5A), 酶处理 0.5 h 即可将 65 g/L 的棉子糖全部水解, 生产 47 g/L 的蜜二糖; 分别以 100、200、300 g/L 的棉子糖为底物, 处理 1、4、3 h 后蜜二糖产量可分别达到 48、143、202 g/L。当加酶量为 5 U 时(图 5B), 分别以 65、100、200、300、400 g/L 的棉子糖为底物, 处理 0.5 h 后蜜二糖产量可分别达到 51、59、139、297、382 g/L, 后续处理时间延长并未有进一步显著提高蜜二糖得率。

2.3.2 BhLS 39 对蔗糖的催化性能验证及产物表征

为探究 BhLS 39 催化蔗糖的产物特征, 联合 TLC、LC-MS、FTIR 和 NMR 技术对催化产物进行检测分析。其中, 基于酶催化产物的 TLC 检测结果(图 6A)可知, 酶催化反应 5 h 后可将大部分蔗糖降解, 生成葡萄糖、果糖、FOS 和果聚糖。基于 LC-MS 的检测结果, 结合相对分子质量不难推测, 酶催化产物中含有单糖(图 6B)、二糖(图 6C)、三糖(图 6D)、四糖(图 6E)和五糖(图 6F)。

基于酶催化产物的 FTIR 分析结果(图 7A)可知, 在 $2\ 118\ \text{cm}^{-1}$ 处有较宽的吸收峰, 表明酶催化产物中存在许多 β -糖苷键。另外, 在 $925\ \text{cm}^{-1}$ 和 $832\ \text{cm}^{-1}$ 处包含重叠带, 表明存在 D-呋喃糖的对称伸缩振动和弯曲振动。因此, 可初步判断酶催化产物中的糖苷键为 β -(2,6)型。

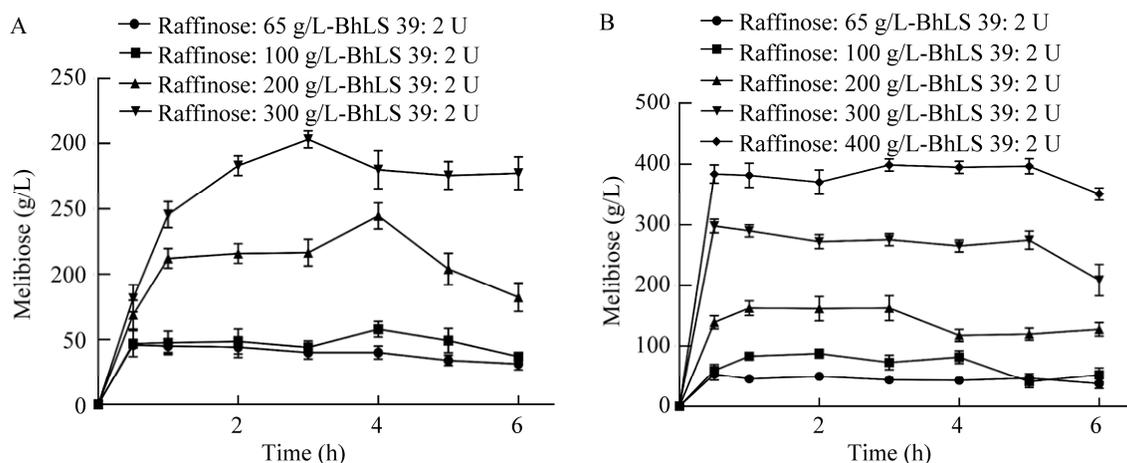
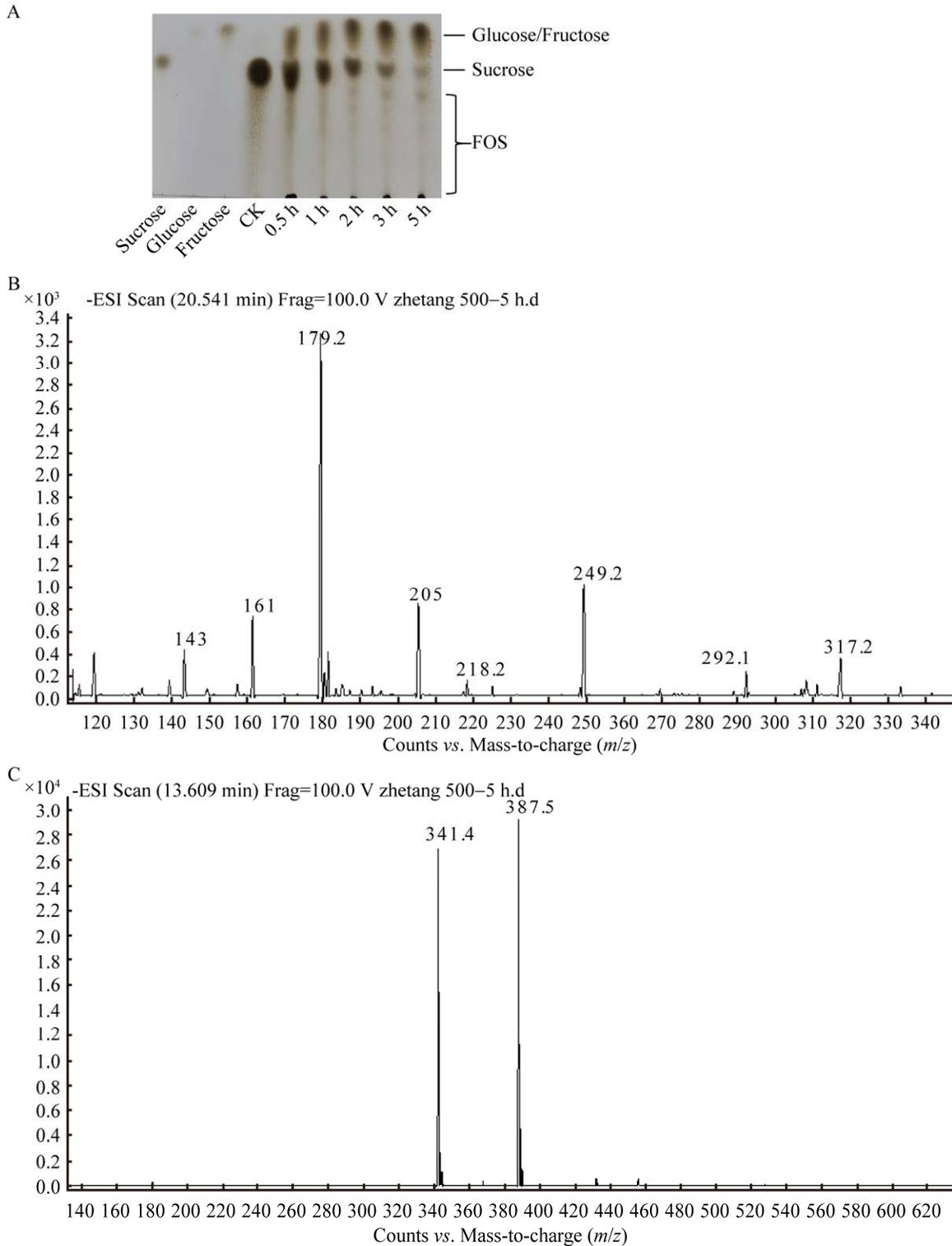


图 5 BhLS 39 催化棉子糖的产物分析

Figure 5 Product analysis of raffinose catalyzed by BhLS 39.

为进一步确定酶催化产物的糖苷键型, 对其进行了 NMR 分析, 结果如图 7B 所示。通过对比 ^{13}C -NMR 谱图发现, 产物的化学位移和

β -(2,6)果聚糖标准品的化学位移最为接近(表 5), 证实了产物中的糖苷键为 β -(2,6)型, 即获得的果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 为 Levan 型蔗糖酶。



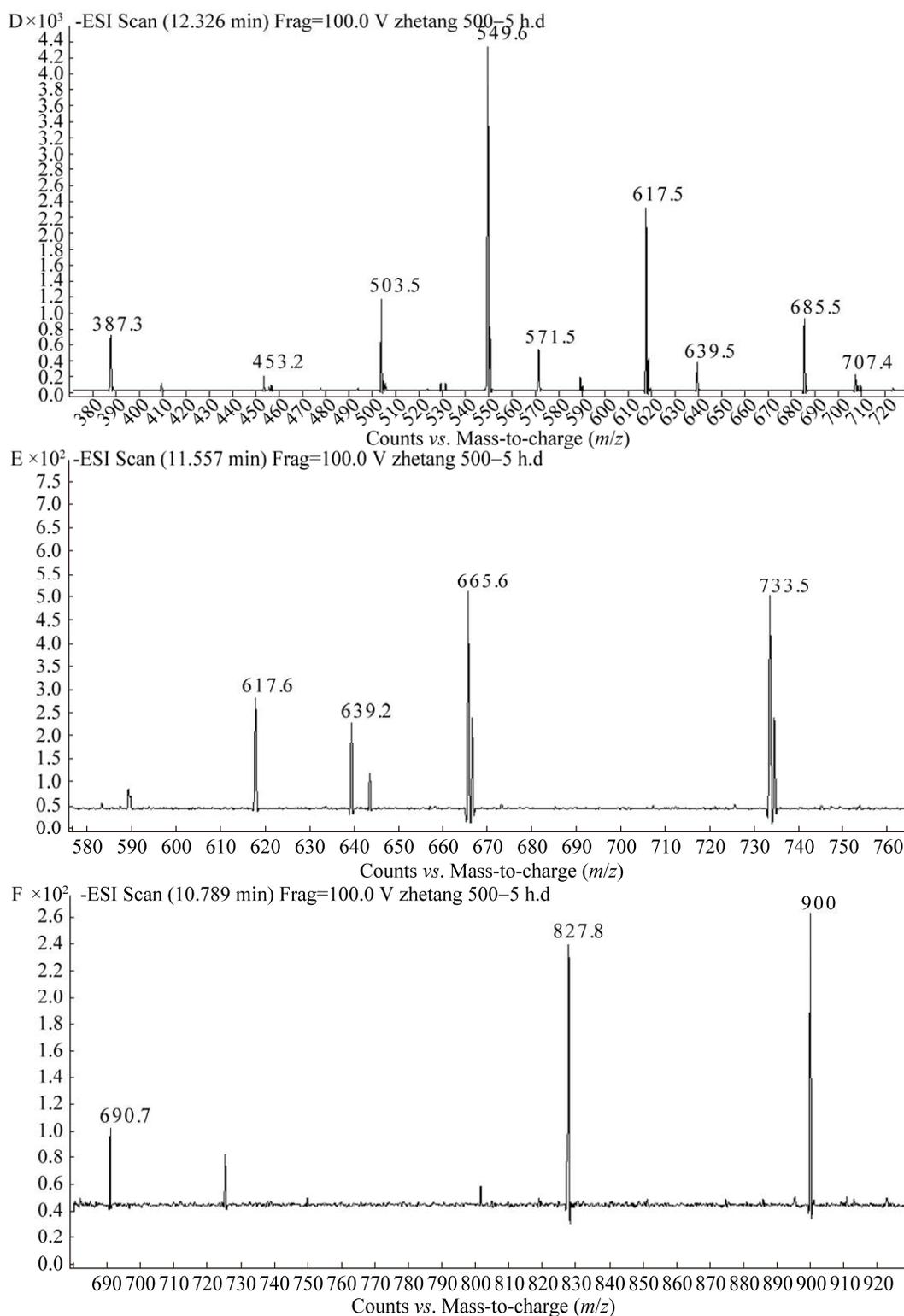


图 6 BhLS 39 对蔗糖催化产物的 TLC 和 LC-MS 分析 A: TLC 分析; B: 单糖; C: 二糖; D: 三糖; E: 四糖; F: 五糖。

Figure 6 TLC and LC-MS analysis of sucrose catalyzed products by BhLS 39. A: TLC analysis; B: Monose; C: Disaccharide; D: Trisugar; E: Tetrasaccharide; F: Five sugars.

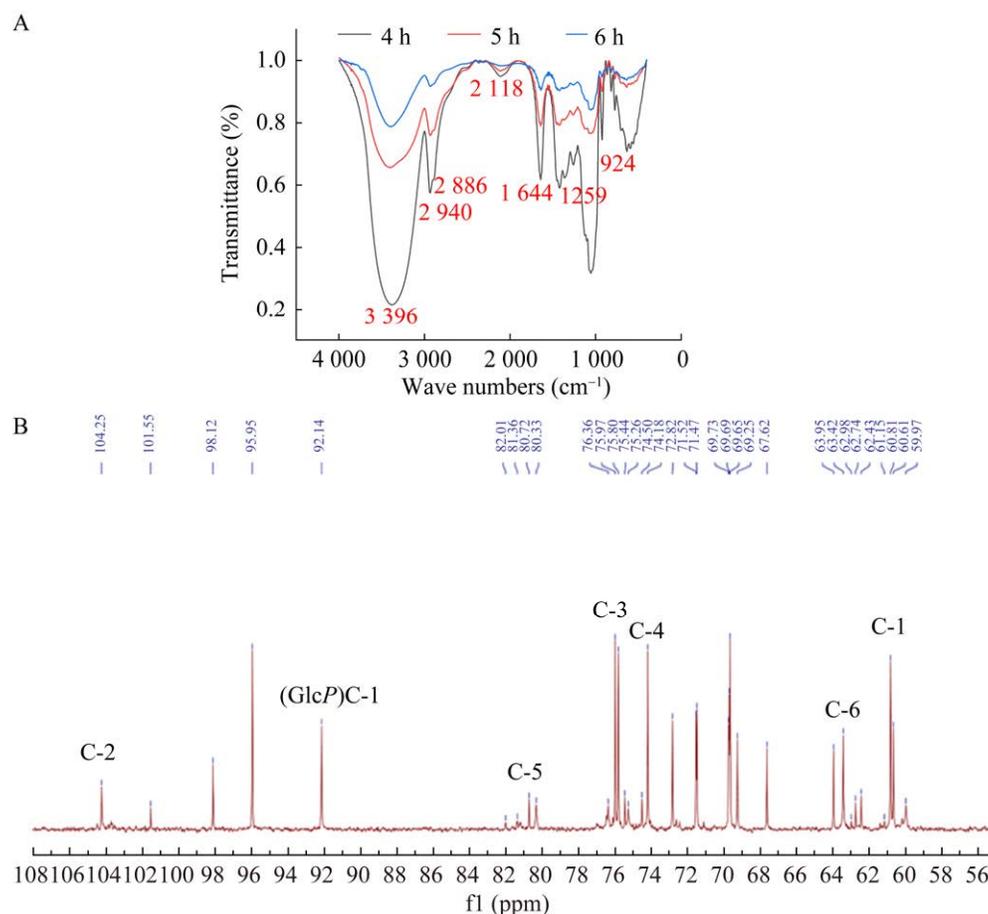


图7 BhLS 39 对蔗糖催化产物的 FTIR 和 NMR 分析 A: FTIR 分析谱; B: ^{13}C -NMR 分析谱。

Figure 7 FTIR and NMR analysis of sucrose catalyzed products by BhLS 39. A: FTIR transglycoside analysis; B: ^{13}C -NMR spectra.

表5 BHLS 39 合成产物的 ^{13}C -NMR 位移标准品对比

Table 5 Comparison of ^{13}C -NMR shift standards for products synthesized by BhLS 39

C atomic chemical shift	Transglycoside product	β -(2,6) fructan standard	β -(2,1) fructan standard
C-1	60.8	60.7	62.1
C-2	104.3	104.2	103.3
C-3	75.8	76.3	77.2
C-4	74.2	75.2	74.3
C-5	80.7	80.3	81.1
C-6	63.4	63.4	62.2

2.4 果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达及优化

2.4.1 BhLS 39 的枯草芽孢杆菌重组菌的构建及摇瓶发酵

由于 BhLS 39 在大肠杆菌中是胞内表达(图

3), 且大肠杆菌会产生内毒素^[24], 故不利于 BhLS 39 的下游分离提取, 限制了 BhLS 39 在食品行业中的应用。为解决上述问题, 本文将 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中进行重组胞外表达。将构建的含有 BhLS 39 的重组表达载体

pBHSS1 (图 1A)转到 *B. subtilis* WB600 中, 从而构建重组菌 BsLS。经摇瓶发酵后发现, 重组菌胞外 BhLS 39 活性随着发酵时间的延长逐渐降低(图 8A)。其中, 培养 12 h 后重组菌 BsLS 胞外活性最高, 为 3.28 U/mL。根据 SDS-PAGE 的检测结果(图 8B)可知, 重组菌 BsLS 仅可在摇瓶发酵 12 h 后的胞外上清中检测到与理论分子量(约 56 kDa)相符的蛋白条带, 这与其胞外活性相符(图 8A)。上述结果表明, 重组菌 BsLS 发酵过程中分泌的胞外蛋白酶对 BhLS 39 降解可能是其胞外活性降低的重要原因。另外, 由图 8B 可知, 重组菌 BsLS 在摇瓶发酵过程中, 其菌体破碎沉淀样品中存在包涵体, 这表明胞内合成的 BhLS 39 蛋白前体未能及时有效地实现跨膜分泌是限制其高效胞外表达的关键因素之一。

2.4.2 共表达伴侣蛋白对 BhLS 39 重组胞外表达的影响

为探究重组菌胞外的蛋白折叠能力的提高以及胞内的蛋白折叠环境的改善对 BhLS 39 重组表达的影响, 分别构建了共表达 PrsA、DnaK 和 GroESL 的重组表达载体 pBHSS1-*prsA* (图

1B)、pBHSS1-*dnaK* (图 1C)和 pBHSS1-*groESL* (图 1D)。然后, 以 *B. subtilis* WB600 为表达宿主, 分别构建了相应的重组菌 BsLS-PrsA、BsLS-DnaK 和 BsLS-GroESL。

经摇瓶发酵后发现, 重组菌 BsLS-PrsA 的胞外 BhLS 39 活性随着培养时间的延长呈先增加后减少的趋势。培养 24 h 后, 胞外 BhLS 39 活性达到最大, 为 16.73 U/mL (图 9), 是对照菌 BsLS 胞外酶活(3.28 U/mL)的 5.1 倍, 这表明通过共表达胞外伴侣蛋白 PrsA 是提高 BhLS 39 重组胞外表达的有效策略。另外, 重组菌 BsLS-DnaK 和 BsLS-GroESL 的最高胞外 BhLS 39 活性分别为 16.07 U/mL 和 12.14 U/mL (图 9), 分别是对照菌 BsLS 胞外酶活(3.28 U/mL)的 4.9 倍和 3.7 倍。其中, 重组菌 BsLS-DnaK 胞外酶活是 BsLS-GroESL 的 1.32 倍, 这表明共表达 DnaK 可能更有利于维持 BhLS 39 胞内蛋白前体处于可转运的未完全折叠状态, 从而促进其胞外分泌表达。

由于分别单独共表达胞外伴侣蛋白 PrsA 和胞内伴侣蛋白 DnaK 或 GroESL 均可有效提高 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的胞外表达量(图 9),

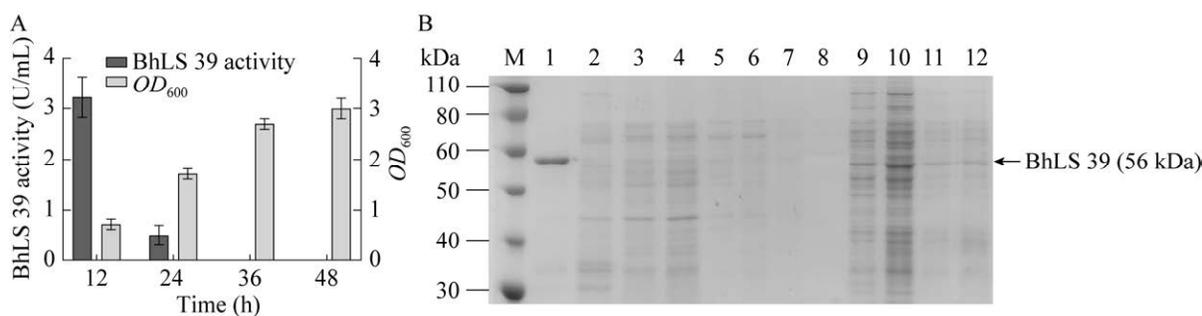


图 8 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达 A: 重组菌 BsLS 的胞外 BhLS 39 活性; B: SDS-PAGE 分析结果。M: Marker; 泳道 1-4: 12、24、36、48 h 的重组菌发酵上清; 泳道 5-8: 12、24、36、48 h 的菌体破碎上清; 泳道 9-12: 12、24、36、48 h 的菌体破碎沉淀。

Figure 8 Recombinant extracellular expression of BhLS 39 in *B. subtilis*. A: Extracellular BhLS 39 activity of BsLS; B: SDS-PAGE analysis results. M: Marker; Lanes 1-4: 12, 24, 36, 48 h fermentation supernatants; Lane 5-8: 12, 24, 36, 48 h cell lysate supernatants; Lane 9-12: 12, 24, 36, 48 h cell lysate precipitates.

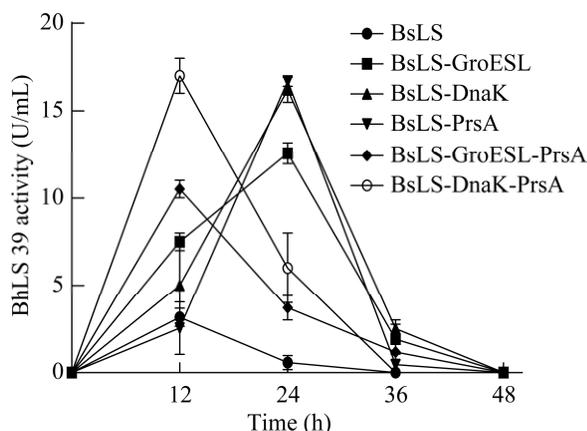


图9 重组菌摇瓶发酵的胞外 BhLS 39 活性曲线
Figure 9 Shake flask fermentation extracellular BhLS 39 activity profile of recombinant strain.

因此进一步考察了串联共表达胞内和胞外伴侣蛋白对 BhLS 39 重组胞外表达的影响。首先,分别构建了串联共表达 DnaK-PrsA 和 GroESL-PrsA 的重组载体 pBHSS1-*dnaK-prsA* 和 pBHSS1-*groESL-prsA* (图 1E、1F),在此基础上,以 *B. subtilis* WB600 为表达宿主,分别获得相应的重组菌 BsLS-DnaK-PrsA 和 BsLS-GroESL-PrsA。经摇瓶发酵后,重组菌 BsLS-DnaK-PrsA 和 BsLS-GroESL-PrsA 的胞外 BhLS 39 活性均呈逐渐降低的趋势,两者的胞外 BhLS 39 活性均在发酵 12 h 后达到最高,分别为 17.00 和 10.59 U/mL (图 9),分别是对照菌 BsLS 胞外酶活(3.28 U/mL)的 5.2 倍和 3.2 倍。尽管重组菌 BsLS-DnaK-PrsA 经摇瓶发酵后的胞外 BhLS 39 活性较重组菌 BsLS-PrsA 的胞外酶活(16.73 U/mL)无明显提高 ($P>0.05$),但是其胞外表达 BhLS 39 的生产效率是重组菌 BsLS-PrsA 的 2 倍[1.42 vs. 0.70 U/(mL·h)]。上述结果表明,与重组菌 BsLS-PrsA 相比,重组菌 BsLS-DnaK-PrsA 在 BhLS 39 后续工业化生产中的应用价值更高。

3 讨论与结论

果聚糖蔗糖酶能够以蔗糖为底物生成 FOS

和果聚糖,以棉子糖为底物生成高附加值的蜜二糖^[5],对于大豆低聚糖的提质增效具有重要意义。然而,已报道的果聚糖蔗糖酶普遍存在对棉子糖的催化效率较低且难以实现酶蛋白的高表达制备等问题,限制了果聚糖蔗糖酶在大豆低聚糖加工行业中的应用。针对上述问题,本研究挖掘了优良的果聚糖蔗糖酶资源,并开展其高效重组胞外表达的研究,从而促进大豆低聚糖的提质增效。

本研究首先从我国西沙群岛和渤海湾沿海区域进行取样,经筛选后获得了一株可高效转化蔗糖和棉子糖的菌株 *B. halotolerans* 2M-39,这是首次报道该菌株来源的果聚糖蔗糖酶。然后,利用具有易培养和遗传操作简单等优点的大肠杆菌对 *B. halotolerans* 2M-39 来源的果聚糖蔗糖酶 BhLS 39 进行重组表达,并经镍柱纯化后获得纯酶。在此基础上,开展重组 BhLS 39 的酶学性质研究。结果显示,本研究中的 BhLS 39 与来源于罗氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*) LTH5448^[25]和枯草芽孢杆菌^[26]的果聚糖蔗糖酶具有相似的酶学性质。值得一提的是, BhLS 39 以棉子糖为底物时的 K_{cat} 为 486.8 s^{-1} ,这是目前报道对棉子糖 K_{cat} 最高的果聚糖蔗糖酶。另外,利用 5 U 的 BhLS 39 对 400 g/L 棉子糖处理 0.5 h 后,可得到 382 g/L 蜜二糖,转化率为 84.6%,高于前期 Xu 等^[4]报道的水平。联合 TLC、LC-MS、FTIR 和 NMR 技术,对 BhLS 39 催化蔗糖酶的产物进行检测可知, BhLS 39 为 Levan 型果聚糖蔗糖酶,其催化蔗糖后可生成含有 β -(2,6)键的 Levan 型 FOS 和果聚糖,这与前期文献报道结果一致,即芽孢杆菌来源的果聚糖蔗糖酶通常为左聚糖蔗糖酶^[27]。本研究的结果表明, BhLS 39 在高效转化大豆低聚糖方面具有重要的应用潜力,后续还需通过开展 BhLS 39 对大豆低聚糖的转化实验进一步验证其实际应

用效果。

为推进 BhLS 39 的实际应用进程,本研究以枯草芽孢杆菌为表达宿主对 BhLS 39 进行了重组胞外表达,获得的重组菌 BsLS 经摇瓶发酵 12 h 后胞外酶活最高(3.28 U/mL)。基于 SDS-PAGE 结果可知(图 8B), BhLS 39 的胞外降解和胞内蛋白前体未能及时有效地实现跨膜分泌是限制其高效胞外表达的关键因素。通过敲除宿主菌胞外蛋白酶基因或者过表达胞外伴侣蛋白基因,从而降低宿主菌胞外降解活性或提高胞外蛋白折叠能力是目前缓解异源蛋白在枯草芽孢杆菌中胞外降解的有效策略^[28]。胞内伴侣蛋白是辅助菌体胞内蛋白前体快速折叠成正确结构或维持可转运的未完全折叠状态的关键因子。枯草芽孢杆菌中目前已知的胞外伴侣蛋白主要是 PrsA,胞内伴侣蛋白主要包括 DnaK 系列和 GroE 系列^[29]。

为进一步提高 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的胞外表达水平,本研究通过共表达胞外和胞内伴侣蛋白,改善重组菌胞外和胞内的蛋白折叠环境。结果表明,通过串联共表达胞外伴侣蛋白 PrsA 和胞内伴侣蛋白 DnaK 获得的重组菌 BsLS-DnaK-PrsA,经摇瓶发酵 12 h 后的胞外 BhLS 39 活性为 17 U/mL(图 9),是对照菌 BsLS 胞外酶活的 5.2 倍。类似地,在前期研究中,共表达 DnaK 和 PrsA 也被证明是提高其他重组蛋白在枯草芽孢杆菌中胞外表达的有效策略。例如,Chen 等^[30]通过共表达 DnaK 将 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 DPEase 在枯草芽孢就中的胞外酶活提高了 1.6 倍;Zhu 等^[31]通过共表达 PrsA 将嗜嗜热 α -淀粉酶 Pfa 在枯草芽孢杆菌中的重组胞外活性提高了 2.7 倍。除优化重组菌胞内外的蛋白折叠环境外,优化目的基因的转录强度、目的蛋白的分泌能力以及重组菌的生长环境也是前期文献中提高外源蛋白在枯草芽孢杆

菌中重组表达水平常采用的策略^[15-16,32]。因此,后续可尝试通过优化启动子、信号肽和重组菌发酵条件进一步提高 BhLS 39 在枯草芽孢杆菌中的胞外活性。

综上,本研究报道了一种新果聚糖蔗糖酶 BhLS 39,并通过共表达伴侣蛋白提高了其在枯草芽孢杆菌中的重组胞外表达水平。本研究的开展不仅有利于促进大豆低聚糖的提质增效,提升大豆加工行业的经济效益,同时也为其他重组蛋白在枯草芽孢杆菌中高效胞外表达提供了策略参考。

REFERENCES

- [1] CAO SC, WANG J, ZHAO JF, LI SW, TANG WJ, DIAO H, LIU JB. Dietary soybean oligosaccharides addition increases growth performance and reduces lipid deposition by altering fecal short-chain fatty acids composition in growing pigs[J]. *Animals*, 2023, 13(23): 3648.
- [2] GENG XR, LEI JY, BAU T, GUO DD, CHANG MC, FENG CP, XU LJ, CHENG YF, ZUO NK, MENG JL. Purification, characterization, and immobilization of a novel protease-resistant α -galactosidase from *Oudemansiella radicata* and its application in degradation of raffinose family oligosaccharides from soymilk[J]. *Foods*, 2022, 11(19): 3091.
- [3] 周晓莉, 许喜林. 大豆低聚糖的生理功能及应用[C]//“健康中国 2030·健康食品的创新与发展”暨 2019 年广东省食品学会学术年会论文集. 广州, 2019: 25-28. ZHOU XL, XU XL. Physiological Function and Application of Soybean Oligosaccharides[C]//“Healthy China 2030 Innovation and Development of Healthy Food” and Proceedings of the 2019 Annual Conference of Guangdong Food Society. Guangzhou, 2019: 25-28 (in Chinese).
- [4] XU W, YU SH, LIU Q, ZHANG T, JIANG B, MU WM. Enzymatic production of melibiose from raffinose by the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(19): 3910-3918.
- [5] CHEN CM, LIN CH, WU YR, YEN CY, HUANG YT, LIN JL, LIN CY, CHEN WL, CHAO CY, LEE-CHEN GJ, SU MT, CHANG KH. Lactulose and melibiose inhibit α -synuclein aggregation and up-regulate autophagy to reduce neuronal vulnerability[J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1230.
- [6] TIAN JJ, WEI SM, JIAO YY, LIANG WX, WANG GY.

- A strategy to reduce the byproduct glucose by simultaneously producing levan and single cell oil using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain displaying levansucrase on the surface[J]. *Bioresource Technology*, 2024, 395: 130395.
- [7] XU W, ZHANG XQ, NI DW, ZHANG WL, GUANG CE, MU WM. A review of fructosyl-transferases from catalytic characteristics and structural features to reaction mechanisms and product specificity[J]. *Food Chemistry*, 2024, 440: 138250.
- [8] KARBOUNE S, SEO S, LI MX, WAGLAY A, LAGACÉ L. Biotransformation of sucrose rich maple syrups into fructooligosaccharides, oligolevans and levans using levansucrase biocatalyst: bioprocess optimization and prebiotic activity assessment[J]. *Food Chemistry*, 2022, 382: 132355.
- [9] NI DW, ZHANG SQ, KIRTEL O, XU W, CHEN QM, ÖNER ET, MU WM. Improving the thermostability and catalytic activity of an inulosucrase by rational engineering for the biosynthesis of microbial inulin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(44): 13125-13134.
- [10] CHEN WJ, LI L, YE CW, ZHAO ZY, HUANG K, ZOU D, WEI XT. Efficient production of extracellular alkaline protease in *Bacillus amyloliquefaciens* by host strain construction[J]. *LWT*, 2022, 163: 113620.
- [11] CASTREJÓN-CARRILLO S, MORALES-MORENO LA, RODRÍGUEZ-ALEGRÍA ME, ZAVALA-PADILLA GT, BELLO-PÉREZ LA, MORENO-ZARAGOZA J, LÓPEZ MUNGUÍA A. Insights into the heterogeneity of levan polymers synthesized by levansucrase Bs-SacB from *Bacillus subtilis* 168[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 323: 121439.
- [12] YI X, LIN L, MEI J, WANG W. Transporter proteins in *Zymomonas mobilis* contribute to the tolerance of lignocellulose-derived phenolic aldehyde inhibitors[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(9): 1875-1882.
- [13] CHU JL, TIAN YN, LI Q, LIU GF, YU Q, JIANG TY, HE BF. Engineering the β -fructofuranosidase Fru6 with promoted transfructosylating capacity for fructooligosaccharide production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(31): 9694-9702.
- [14] PUT H, GERSTMANS H, VANDE CAPELLE H, FAUVART M, MICHIELS J, MASSCHELEIN J. *Bacillus subtilis* as a host for natural product discovery and engineering of biosynthetic gene clusters[J]. *Natural Product Reports*, 2024, 41: 1113-1151.
- [15] 孙惟沁, 沐万孟, 张涛, 江波. 产果聚糖蔗糖酶重组枯草芽孢杆菌的构建及表达[J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(10): 79-86.
- SUN WQ, MU WM, ZHANG T, JIANG B. Construction and expression of a recombinant *Bacillus subtilis* producing levansucrase[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2019, 38(10): 79-86 (in Chinese).
- [16] MIAO HB, ZHE YY, XIANG X, CAO Y, HAN NY, WU Q, HUANG ZX. Enhanced extracellular expression of a Ca^{2+} - and Mg^{2+} -dependent hyperthermostable protease EA1 in *Bacillus subtilis* via systematic screening of optimal signal peptides[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(50): 15830-15839.
- [17] ÖKTEM A, PRANOTO DA, van DIJL JM. Post-translational secretion stress regulation in *Bacillus subtilis* is controlled by intra- and extracellular proteases[J]. *New Biotechnology*, 2024, 79: 71-81.
- [18] ZHANG K, TAN RT, YAO DB, SU LQ, XIA YM, WU J. Enhanced production of soluble *Pyrococcus furiosus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through chaperone co-expression, heat treatment and fermentation optimization[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 31(4): 570-583.
- [19] CHEN YD, XIN QL, PAN L, WANG B. Improved recombinant expression of maltogenic α -amylase AmyM in *Bacillus subtilis* by optimizing its secretion and NADPH production[J]. *Fermentation*, 2023, 9(5): 475.
- [20] YAO DB, SU LQ, LI N, WU J. Enhanced extracellular expression of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase in *Bacillus subtilis* through signal peptide optimization, chaperone overexpression and α -amylase mutant selection[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 69.
- [21] 贺福初. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2021.
- HE FC. Experimental guide to molecular cloning (third edition)[M]. Beijing, Science Press, 2021 (in Chinese).
- [22] 胥琳峰, 于文文, 朱学文, 张权威, 武耀康, 李江华, 堵国成, 吕雪芹, 陈坚, 刘龙. 代谢工程改造大肠杆菌高效合成 L-瓜氨酸[J]. *生物工程学报*, 2024-04-24. DOI: 10.13345/j.cjb.240190
- XV LF, YU WM, ZHU XW, ZHANG GQ, WU YK, LI JH, DU GC, LV XQ, CHEN J, LIU L. Efficient synthesis of L-citrulline from *Escherichia coli* by metabolic engineering[J]. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2024-04-24. DOI: 10.13345/j.cjb.240190 (in Chinese).
- [23] 魏玉霞, 张显, 胡孟凯, 邵宇, 潘珊, 藤田盛久, 饶志明. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶重组枯草芽孢杆菌构建及固定化应用[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4303-4313.
- WEI YX, ZHANG X, HU MK, SHAO Y, PAN S, Morihisa Fujita, RAO ZM. Construction and immobilization of recombinant *Bacillus subtilis* with D-allulose 3-epimerase[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4303-4313 (in Chinese).
- [24] WANG LJ, GUO YY, SHEN YZ, YANG K, CAI X, ZHANG B, LIU ZQ, ZHENG YG. Microbial production of sulfur-containing amino acids using

- metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Advances*, 2024, 73: 108353.
- [25] NI DW, XU W, BAI YX, ZHANG WL, ZHANG T, MU WM. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 29-37.
- [26] SZWENGIEL A, GODERSKA K, GUMIENNA M. Synthesis of β -(2-6)-linked fructan with a partially purified levansucrase from *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 131: 1-9.
- [27] HILL A, CHEN L, MARIAGE A, PETIT JL, de BERARDINIS V, KARBOUNE S. Discovery of new levansucrase enzymes with interesting properties and improved catalytic activity to produce levan and fructooligosaccharides[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(11): 2931-2944.
- [28] ZHANG K, SU LQ, WU J. Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2020, 11: 295-318.
- [29] YAO DB, ZHANG K, SU LQ, LIU ZZ, WU J. Enhanced extracellular *Bacillus stearothermophilus* α -amylase production in *Bacillus subtilis* by balancing the entire secretion process in an optimal strain[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2021, 168: 107948.
- [30] CHEN J, WEI HB, GUO Y, LI QF, WANG HY, LIU JD. Chaperone-mediated protein folding enhanced D-psicose 3-epimerase expression in engineered *Bacillus subtilis*[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 103: 65-70.
- [31] ZHU XY, ZHANG K, LUO H, WU J. Overexpression of the class A penicillin-binding protein PonA in *Bacillus* improves recombinant protein production[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 383: 129219.
- [32] LI H, YAO DB, YING JR, HAN XD, ZHANG XC, FANG XJ, FANG ZM, XIAO YZ. Enhanced extracellular raw starch-degrading α -amylase production in *Bacillus subtilis* through signal peptide and translation efficiency optimization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2022, 189: 108718.