

研究报告



重组共表达大肠杆菌细胞从 D-葡萄糖一锅法生产 D-甘露糖

吴昊¹ 黄嘉苇¹ 张文立^{1,2} 沐万孟^{*1,2}

1 江南大学食品科学与技术国家重点实验室 江苏 无锡 214122

2 江南大学食品安全国际合作联合实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】D-甘露糖的酶促转化方法已受到相当大的关注。【目的】研究 D-葡萄糖异构酶(D-glucose isomerase, D-Glase)和 D-果糖异构酶(D-fructose isomerase, D-FIase)共表达于大肠杆菌细胞生产 D-甘露糖的工艺条件。【方法】将 D-Glase 和 D-FIase 基因片段合成后酶切连接到载体 pCDFDuet-1 上, 构建 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI 重组质粒并导入到大肠杆菌 BL21(DE3)中共表达, 通过摇瓶培养得到产 D-Glase 和 D-FIase 的菌体, 测定该共表达细胞体系的反应条件。【结果】添加 1 mmol/L Co^{2+} , 共表达体系酶的最适温度和 pH 分别为 70 °C 和 6.0。以浓度分别为 100、300、500 g/L 的 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖, 平衡后 D-甘露糖质量浓度分别为 13.8、38.1、62.6 g/L, 相应的转化率分别为 13.8%、12.7%、12.5%, D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖的平衡比约为 50:37.5:12.5。【结论】D-Glase 和 D-FIase 在大肠杆菌细胞中组成的共表达体系通过一锅法可利用 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖。

关键词: 一锅法, 异构酶, D-葡萄糖, D-甘露糖, 共表达, 大肠杆菌

One-pot production of D-mannose from D-glucose by recombinant co-expressing *Escherichia coli* cellsWU Hao¹ HUANG Jia-Wei¹ ZHANG Wen-Li^{1,2} MU Wan-Meng^{*1,2}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] Enzymatic transformation for production of D-mannose has attracted considerable attention. [Objective] The production conditions of D-mannose were investigated using the co-expressed *E. coli* cells harboring D-glucose isomerase (D-Glase) and D-fructose isomerase (D-FIase). [Methods] The synthesized D-Glase and D-FIase gene fragments were digested and ligated into the vector pCDFDuet-1. Then, the resultant recombinant plasmid pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI was transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain to co-express the two enzymes. After collecting the cells co-expressing D-Glase and D-FIase by shake flask culture, the reaction conditions of the co-expression cells were determined. [Results] The optimal temperature and pH of enzymes in the co-expressing system were 70 °C

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31922073, 31801583); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180607)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85919161; E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn

Received: 13-03-2020; **Accepted:** 24-05-2020; **Published online:** 15-06-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31922073, 31801583); 江苏省自然科学基金(BK20180607)

***通信作者:** Tel: 0510-85919161; E-mail: wmmu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-03-13; **接受日期:** 2020-05-24; **网络首发日期:** 2020-06-15

and 6.0 in the presence of Co^{2+} (1 mmol/L), respectively. After the reaction reached equilibrium, 13.8, 38.1 and 62.6 g/L of D-mannose were obtained from 100, 300 and 500 g/L of D-glucose, which corresponded to a conversion of 13.8%, 12.7% and 12.5%, respectively, and the equilibrium ratio of D-glucose, D-fructose and D-mannose was about 50:37.5:12.5. **[Conclusion]** A co-expression system consisted of D-Glase and D-Llase in *E. coli* cells can be used for one-pot production of D-mannose from D-glucose.

Keywords: One-pot, Isomerase, D-glucose, D-mannose, Co-expression, *Escherichia coli*

近年来, 超重和肥胖正成为全球性的健康问题, 因为其增加了患心血管疾病、II 型糖尿病和代谢综合征的风险^[1]。这些疾病的原因多是因为不良的饮食习惯以及高糖和高脂肪食物的过量摄入^[2]。因此, 寻找低甜度的蔗糖替代品, 开发具有生理价值的功能食品成为了食品工业的重要目标^[3]。

D-甘露糖是 D-葡萄糖在 C-2 位的差向异构体, 也是 D-果糖的醛糖异构体。其甜度相当于蔗糖甜度的 60%, 并且甜度不会随浓度的增加而增加^[4]。此外, D-甘露糖热值为 3.75 kcal/g, 低于其他糖类^[5]。自然界中 D-甘露糖天然存在于甘露聚糖、半纤维素和纤维素中^[6]。D-甘露糖具有的这些重要的生理功能, 使其可作为膳食补充剂对人体健康做出贡献。D-甘露糖已被证明是合成维生素^[7]、抗肿瘤药^[8]和免疫刺激剂^[9]的重要前体。此外, D-甘露糖也被认为是工业生产功能性甜味剂 D-甘露糖醇的最佳原料^[10]。因此, D-甘露糖在食品和医疗工业中得到广泛应用, 近年来引起人们的广泛关注。

目前, D-甘露糖的生产方法主要是天然提取法和化学合成法。例如, 利用微波辅助结合硫酸处理法从脱蛋白的棕榈仁中提取 D-甘露糖, 当底物与溶剂的质量体积比为 1:49.69 时, 在 148 °C 条件下连续处理约 10 min, D-甘露糖的回收率达到 92.11%^[11]。在 98 °C、pH 2.0 条件下, 55%浓度的 D-葡萄糖加入钼酸铵催化剂反应约 150 min 后, 可获得 32.6%的 D-甘露糖^[12]。然而, 天然提取法由于被提取植物细胞壁中较高的结晶度和聚合作用, 使用酸水解和热水解从含甘露聚糖的材料中提取 D-甘露糖又需要高温等严格的条件, 大大提高了提取成本^[6]。另外, D-甘露糖的化学合成涉及复杂的反应, 该反应通常在高温和强酸性环境下进行, 并且

需要用到一种或几种催化剂的参与, 在制造过程中增加了副产物和有害污染物的产生^[6]。

生物转化法因其温和的反应条件和较少的有害副产物, 越来越受到广泛的关注。目前, 以 D-果糖或 D-葡萄糖为底物, 可以使用 4 种类型的酶来生产 D-甘露糖: 包括 D-来苏糖异构酶(D-lyxose isomerase, D-Llase, EC 5.3.1.15)^[13-14]、D-甘露糖异构酶(D-mannose isomerase, D-Mlase, EC 5.3.1.7)^[15-16]、纤维二糖 2-差向异构酶(cellobiose 2-epimerase, CEase, EC 5.1.3.11)^[17]和 D-甘露糖 2-差向异构酶(D-mannose 2-epimerase, D-MEase, EC 5.1.3)^[18]。其中, D-Llase 和 D-Mlase 可以催化 D-果糖异构化为 D-甘露糖。然而, D-果糖的价格略高于 D-葡萄糖, 这将增加工业生产的成本。此外, 尽管 D-MEase 和 CEase 可以催化 D-葡萄糖向 D-甘露糖的差向异构化, 但是该过程产生了较多的副产物 D-果糖。

当前, 两步异构化法反应可利用较廉价的单糖转化生产得到较高价值的糖, 因此可作为工业上生产重要糖的替代方法。例如 Patel 等利用 D-木糖异构酶(D-xylose isomerase, D-Xlase)和 D-Llase 体外催化, 以 D-木糖为底物生产 D-来苏糖^[19]。其中, D-Xlase 可将 D-木糖转化为 D-木酮糖, 随后 D-Llase 将中间体 D-木酮糖转化为 D-来苏糖。类似地, 可使用 D-葡萄糖异构酶(D-glucose isomerase, D-Glase)和 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-psicose 3-epimerase, DPEase)从 D-葡萄糖生产 D-阿洛酮糖^[20]。D-Glase 将 D-葡萄糖转化为 D-果糖, 然后通过 DPEase 将 D-果糖异构化为 D-阿洛酮糖。因此, 理论上利用 D-Glase 和 D-Llase 从 D-葡萄糖生产 D-甘露糖是一种可行的策略(图 1)。

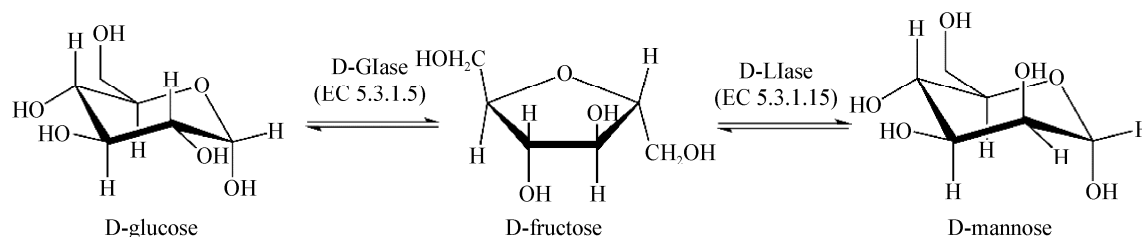


图1 D-葡萄糖异构酶和 D-来苏糖异构酶组成的共表达系统由 D-葡萄糖生产 D-甘露糖反应示意图

Figure 1 The reaction diagram of D-mannose production from D-glucose using co-expression system consisting of D-glucose isomerase (D-Glase) and D-lyxose isomerase (D-Llase)

来源于 *Acidothermus cellulolyticus* 的 D-Glase 在高温和弱酸环境中稳定, 并且当 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 存在时, 在 80 °C 和 pH 6.5 条件下表现出最大活性^[21]。来源于 *Peptococcaceae bacterium* 1109 的 D-Llase 在 70 °C 和 pH 7.5 条件下加入 Co^{2+} 显示出最大活性^[22]。在本研究中, 将上述两种已报道的 D-Glase 和 D-Llase 重组酶基因片段克隆并转化连接至质粒中, 所形成的重组质粒 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI 进一步导入到 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中共表达。之后对共表达反应体系生产 D-甘露糖的最适温度、pH 和金属离子依赖性进行研究。此外, 还利用构建的共表达细胞 *E. coli* BL21(DE3) 以 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖。我们的研究提供了利用在同一细胞中共表达 D-Glase 和 D-Llase, 并通过一锅法从 D-葡萄糖生产 D-甘露糖的新思路, 这项研究以期在工业生产 D-甘露糖提供了可行的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验室所用菌株 *E. coli* BL21(DE3) 和 *E. coli* DH5 α 购买自生工生物工程(上海)股份有限公司。表达载体 pCDFDuet-1 购买自上海捷瑞生物工程有限公司。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0。pH 到 7.0, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。链霉素终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂粉 15.0。pH 到 7.0, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。链霉素终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母提取物、胰蛋白胨、链霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG), 生工生物工程(上海)股份有限公司; D-果糖、D-甘露糖、D-葡萄糖, Sigma-Aldrich 公司; 其他化学试剂为分析纯。

pH 计, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; 蛋白电泳设备、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱仪(HPLC)、Carbomix Ca-NP10 色谱柱、示差折光检测器(RI), Waters 公司。

1.2 方法

1.2.1 共表达体系的构建

D-Glase 来自 *A. cellulolyticus* (GenBank 登录号为 ABK53836), 经测算其基因片段全长 1 224 bp, 可编码 407 个氨基酸。D-Llase 来自 *P. bacterium* (GenBank 登录号为 KLU40859.1), 经测算其基因片段全长为 543 bp, 可编码 180 个氨基酸。将 D-Glase 和 D-Llase 基因序列委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 基因序列中分别含有 *Nco* I 和 *Hind* III 及 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点。将合成的基因片段运用双酶切手段依次将 D-Glase 和 D-Llase 基因片段连接至同样双酶切后的 pCDFDuet-1 质粒, 并分别插入到限制性酶切位点 *Nco* I 和 *Hind* III 及 *Nde* I 和 *Xho* I, 得到重组质粒 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI (图 2), 具体实验操作可参考文献[21]。

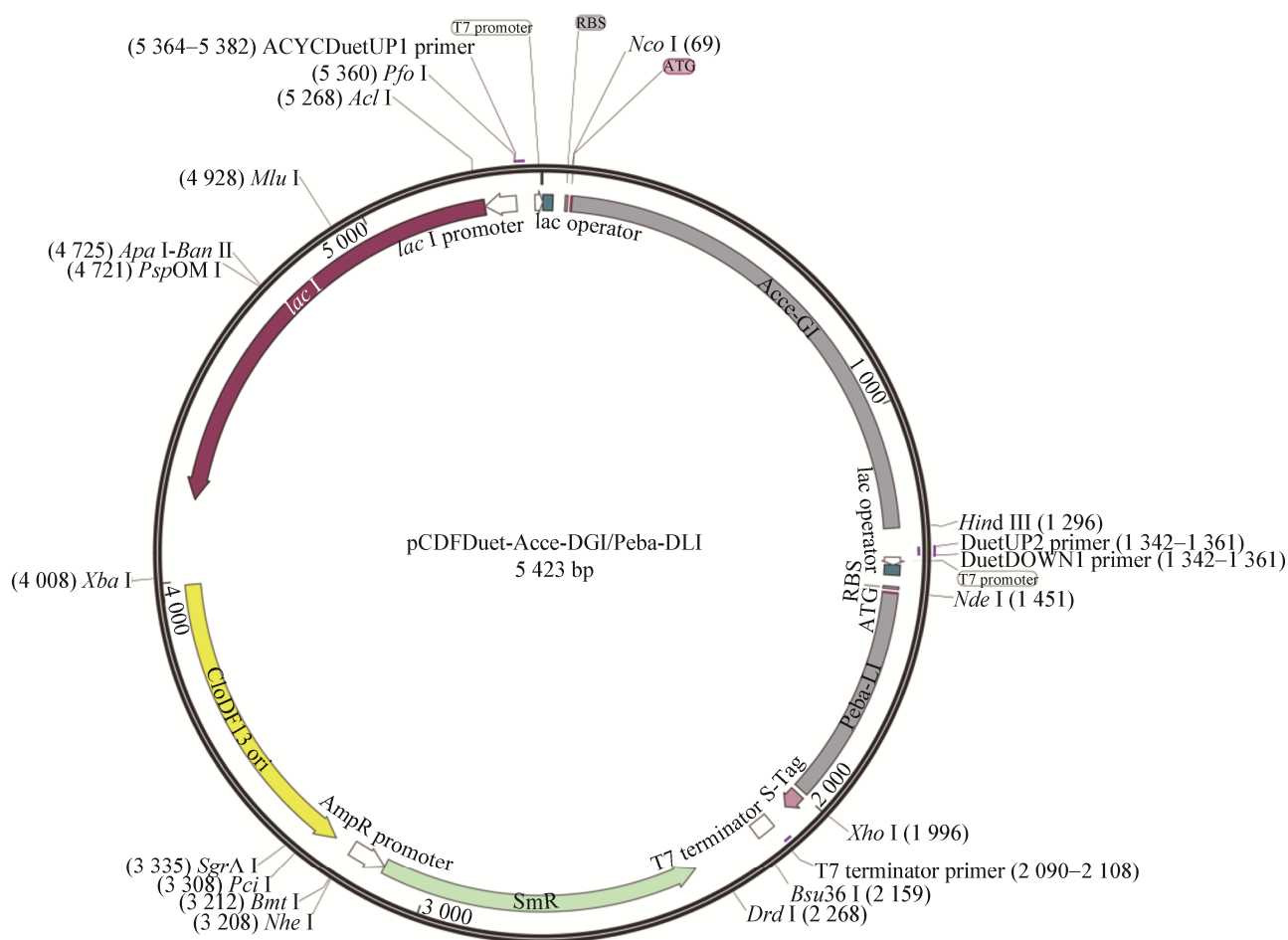


图2 重组质粒 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI 的构建

Figure 2 Constructed recombinant plasmid pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI

将重组质粒导入到 *E. coli* BL21(DE3)中,并涂布在含链霉素终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 固体培养基平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,由于 pCDFDuet-Acce-DGI/Deba-DLI 载体上含有抗链霉素基因片段,成功转化的菌体会在平板上形成菌落。挑取成功转化的重组菌单菌落,接种到 4 mL 含链霉素终浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 LB 液体培养基中,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜,然后将 4 mL 种子液全部转移到 200 mL 含链霉素的 LB 液体培养基中,同样条件下继续培养到 OD_{600} 约为 0.6–0.8 时,添加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,将摇瓶转移至 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 诱导培养 6 h,并且在 0、2、4、6 h 取样保留。之后 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,并用超纯水洗涤

2 次以除去残留的培养基,将重组菌体放在低温冷藏。

1.2.2 D-Glase 和 D-LIase 的蛋白分子量测定

通过 SDS-PAGE 电泳检测 D-Glase 和 D-LIase 的表达效果,分离胶和浓缩胶的丙烯酰胺以 12% (质量体积比)和 4% (质量体积比)比例配制,将 1.2.1 中在 0、2、4、6 h 的取样样品处理后上样完成 SDS-PAGE 过程。电泳结束后用考马斯亮蓝染色 1–3 h 至深蓝色,然后用脱色液脱色至透明,通过与标准蛋白 Marker 以及分别表达纯化的 D-Glase 和 D-LIase 来确定细胞内重组蛋白的成功表达。

1.2.3 共表达体系酶活性测定

构建反应体系 1 mL: 50 mmol/L PBS (pH 6.0), 50 g/L D-葡萄糖, 1 mmol/L Co^{2+} , 20 g/L 湿重菌体

细胞^[20,23]。将反应体系在 70 °C 下反应 30 min 后通过 10 min 沸水浴终止反应,使用 HPLC 检测 D-甘露糖的生成量。

D-甘露糖检测: 将反应体系 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min 取上清液,用 0.22 μm 微滤膜过滤,将过滤液稀释进行 HPLC 检测。检测条件: Waters 高效液相色谱仪,示差折光检测器(RI),Carbomix Ca-NP10 离子色谱柱(10 μm, 7.8×300 mm),流动相为超纯水,柱温 85 °C,流速 0.6 mL/min。

1.2.4 温度对共表达体系酶活性的影响测定

最适温度测定: 将 pH 6.0 的 1 mL 反应体系(50 mmol/L PBS, 50 g/L D-葡萄糖, 1 mmol/L Co²⁺, 20 g/L 湿重菌体细胞)分别在 40、45、50、55、60、65、70、75、80 °C 的水浴锅环境中反应,并将结果中的最高活性设定为相对活性 100%。

热稳定性测定: 将共表达体系大肠杆菌细胞在 50、55、60、65 °C 条件下孵育,定时取样加入到 1 mL 反应体系中,测定不同温度取样的活性,并将初始酶活设定为相对活性 100%,对相对活性作图,研究大肠杆菌细胞中共表达酶的热稳定性。

1.2.5 pH 对共表达体系酶活性的影响测定

配制 3 种缓冲液系统(50 mmol/L): 醋酸盐缓冲液(pH 5.0–6.0), 磷酸盐缓冲液(pH 6.0–7.5)和 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0)。将反应体系置于 70 °C 不同 pH 条件下进行反应,并将结果中的最高活性设定为相对活性 100%。

1.2.6 金属离子对共表达体系酶活性的影响测定

将不同浓度的金属离子 Co²⁺、Ba²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺和 Cu²⁺分别加入到反应体系中,每种金属离子在不同反应系统中的终浓度分别为 0.5、1.0、3.0、5.0 mmol/L。在最适条件下,将测得的活性进行比较,并将不添加金属离子的一组设定为相对活性 100%。

1.2.7 以 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖的研究

研究共表达大肠杆菌细胞以 D-葡萄糖为底物

生产 D-甘露糖,在上述测定的最佳条件下(pH 6.0, 70 °C), 50 g/L 菌体细胞, 1.0 mmol/L Co²⁺, 以不同初始浓度 100、300、500 g/L 的 D-葡萄糖作为底物,定时从反应体系中取样,使用 HPLC 检测 D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖的时间变化过程,直至反应达到平衡。

2 结果与讨论

2.1 带有 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI 载体的大肠杆菌细胞共表达

经过 SDS-PAGE 蛋白电泳检测(图 3),得到两条明显较宽的蛋白条带,经测算在该处 D-Glase 和 D-Liase 的分子量大小分别约为 42 kD 和 21 kD,与先前报道^[21–22]基本一致,并且随着诱导时间的延长,该处的条带逐渐加宽,表明 D-Glase 和 D-Liase 成功表达,共表达效果较好。此外,液相结果表明 D-Glase 和 D-Liase 均在重组大肠杆菌细胞中共表达,并表现出适当的催化活性(图 4)。

2.2 温度对共表达体系酶活性的影响

温度在酶促反应中起着重要的作用,是影响催化效率和反应平衡的重要条件之一^[24]。温度对共表达体

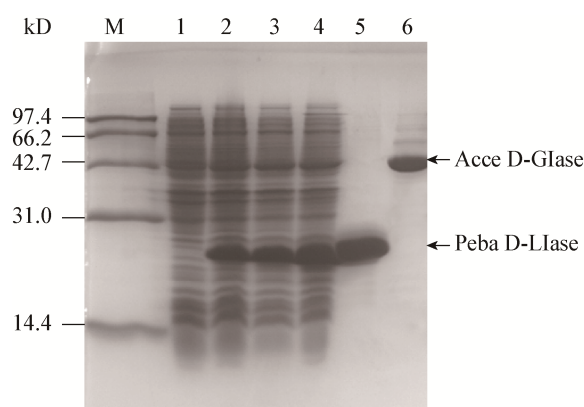


图 3 共表达 D-Glase 和 D-Liase 的 SDS-PAGE 电泳图
Figure 3 SDS-PAGE electrophoresis of the co-expressing D-Glase and D-Liase

注: M: 标准蛋白; 1–4: 加入 IPTG 诱导 0、2、4、6 h 的全细胞; 5–6: 纯化蛋白: D-Liase 和 D-Glase。

Note: M: Protein Marker; 1–4: The cells after IPTG induction for 0, 2, 4, 6 h, respectively; 5–6: Purified protein: D-Liase and D-Glase.

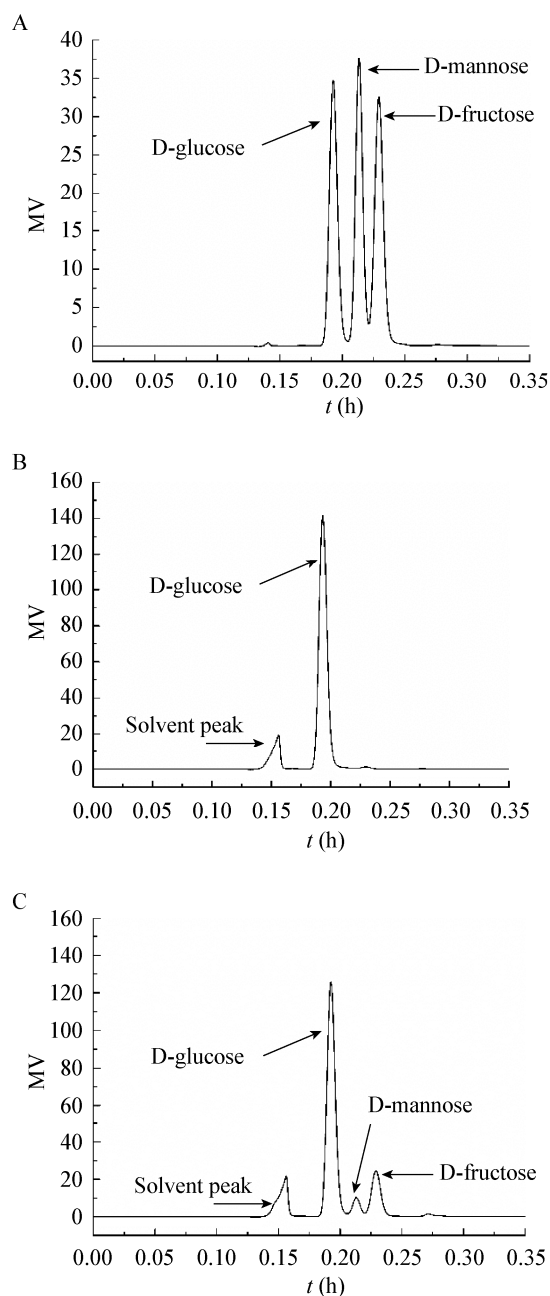


图4 共表达细胞催化活性液相检测情况

Figure 4 The HPLC results of catalytic activity of co-expressing cells

注: A: D-葡萄糖、D-果糖、D-甘露糖标准品水溶液液相图; B: 未含 D-Glase 和 D-Llase 的大肠杆菌细胞转化 D-葡萄糖液相图; C: 含 D-Glase 和 D-Llase 的大肠杆菌细胞转化 D-葡萄糖液相图。
Note: A: The HPLC results of mixed standard sample of D-glucose, D-mannose and D-fructose dissolved in deionized water; B: Reaction with *E. coli* cells not harboring D-Glase and D-Llase; C: Reaction with *E. coli* cells harboring D-Glase and D-Llase.

系酶活性的影响如图 5A 所示。共表达体系的最适温度为 70 °C, 与 *P. bacterium* D-Llase 的最适温度^[22]相同, 但低于 *A. cellulolyticus* D-Glase 的最适温度 (80 °C)^[21]。温度在 60–75 °C 范围内, 共表达体系酶的活性可保持最大活性的 60% 以上, 在 80 °C 时失活。

图 5B 显示了共表达体系酶分别在 50、55、60、65 °C 条件下孵育后的热稳定性情况。总体观察当温度小于 60 °C 时, 共表达体系酶表现出相对较好的热稳定性。将共表达体系酶在 50、55、60 °C 下孵育 2 h 后, 共表达体系酶的相对活性分别降低至最大活性的 52%、37% 和 33%。在 50、55、60、65 °C 下, D-Glase 和 D-Llase 共表达系统的衰减常数(k_d)为 0.391 8、0.492 5、0.661 0、1.018 3 h⁻¹, 根据公式 $t_{1/2} = \ln 2 / k_d$ 计算出相应的半衰期分别为 1.77、1.41、1.05、0.68 h。

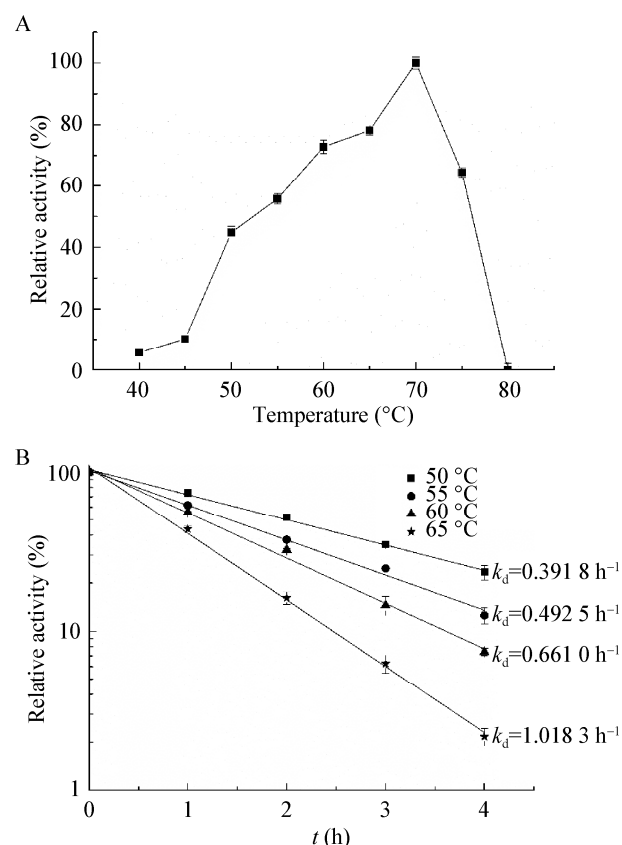


图5 温度对共表达体系酶活性的影响

Figure 5 Effect of temperatures on the activity of the co-expression enzymes

注: A: 共表达体系酶的最适温度; B: 共表达体系酶的温度稳定性。
Note: A: The optimal temperature of the co-expression enzymes; B: The thermostability of the co-expression enzymes.

2.3 pH 对共表达体系酶活性的影响

从图 6 可知,共表达体系酶的最适 pH 为 6.0 (磷酸盐缓冲体系), 低于游离 *A. cellulolyticus* D-Glase (pH 6.5)^[21]和游离 *P. bacterium* D-Llase (pH 7.5)^[22], 并且在 pH 值为 6.5 和 7.0 时可分别保持最大活性的 90%和 52%, 但当 pH 值为 5.5 和 7.5 时, 相对活性急剧降低, 分别为 21%和 11%。上述结果表明共表达体系酶的活性容易受 pH 的影响, 在弱酸环境(pH 6.0–6.5)条件下可以保持较大活性。该性质对于 D-甘露糖的生产是有益的, 因为略带酸性的环境可以有效抑制碳水化合物的美拉德(褐变)反应, 防止产生非酶褐变和减少副产物的产生, 从而证明了其在工业生产 D-甘露糖中的潜在价值。

2.4 金属离子对共表达体系酶活性的影响

金属离子在催化过程中通常作为辅助因子或激活剂, 在酶的催化反应中起着非常关键的作用。本文研究了不同二价金属离子对共表达体系酶催化活力的影响, 以未添加金属离子的反应系统作为空白对照组, 从表 1 可以看出, 金属离子对共表达体系酶的催化活力有比较大的影响。当 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 存在时, 没有表现出对共表达体系酶活性的影响; 当 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 这些金属离子存在时均不同程度地提高了共表达体系酶的活性, 其中 Co^{2+} 存在时共表达体系酶表现出最

表 1 金属离子对共表达体系酶催化活性的影响(相对活性 \pm 误差, %)

Table 1 Effect of metal ions on the activity of the co-expression enzymes (relative activity \pm error, %)

金属离子 Metal ions	0.5	1.0	3.0	5.0
Blank	0	0	0	0
Co^{2+}	85.5 \pm 2.32	100 \pm 0.31	103 \pm 1.22	104 \pm 2.08
Mn^{2+}	8.43 \pm 0.56	8.84 \pm 0.38	8.14 \pm 0.43	8.02 \pm 1.29
Ni^{2+}	19.88 \pm 2.16	21.77 \pm 1.17	18.0 \pm 1.53	16.72 \pm 3.21
Fe^{2+}	6.52 \pm 0.89	6.80 \pm 0.30	5.73 \pm 0.36	5.12 \pm 0.75
Zn^{2+}	1.06 \pm 0.72	2.72 \pm 0.52	1.51 \pm 0.95	0
Mg^{2+}	2.12 \pm 0.38	4.08 \pm 0.61	20.0 \pm 1.23	0
Ca^{2+}	0	0	0	0
Ba^{2+}	0	0	0	0
Cu^{2+}	0	0	0	0

大活性, 与先前报道^[21–22]一致, 而未添加金属离子的对照组, 未表现出任何活性, 从而表明了 D-Glase 和 D-Llase 是金属离子依赖性酶。另外, 还可以看出 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Fe^{2+} 这些金属离子的添加量为 1 mmol/L 时最大程度地提高了共表达体系酶催化活性, 为最适添加量。

2.5 以 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖的研究

在最佳条件下(pH 6.0, 70 °C, 1 mmol/L Co^{2+}), 使用构建的带有 pCDFDuet-Acce-DGI/Pebs-DLI 载体的重组大肠杆菌细胞, 以初始浓度分别为 100、300、500 g/L 的 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖。如图 7 所示, 在 5、8、10 h 后分别达到平衡状态。平衡后得到的 D-果糖质量浓度分别为 42.2、112.8、185.0 g/L, 分别显示出 42.2%、37.6%和 37.0%的转化率; D-甘露糖质量浓度分别为 13.8、38.1、62.6 g/L, 相应的转化率分别为 13.8%、12.7%和 12.5%。在达到反应平衡后, D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖的平衡比约为 50:37.5:12.5。目前, 模拟移动床技术被广泛使用在制备和分离许多精细化学品和生化物质, 特别是在手性分离过程中, 包括蛋白质和糖^[25]。这一技术同样适用于分离这 3 种单糖。郭翔海等发明了模拟移动床来分离 D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖这 3 种混合物的方法^[26]。

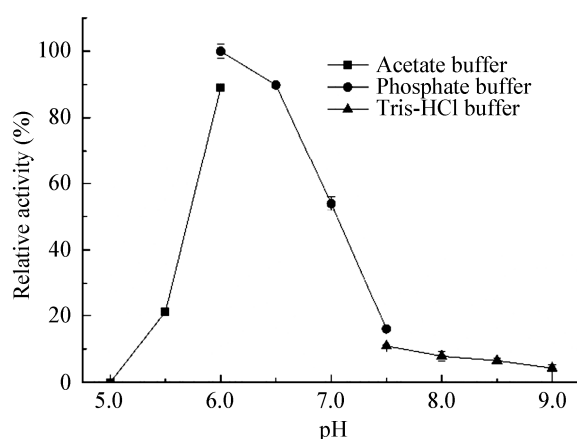


图 6 pH 对共表达体系酶活性的影响

Figure 6 Effect of pH on the activity of the co-expression enzymes

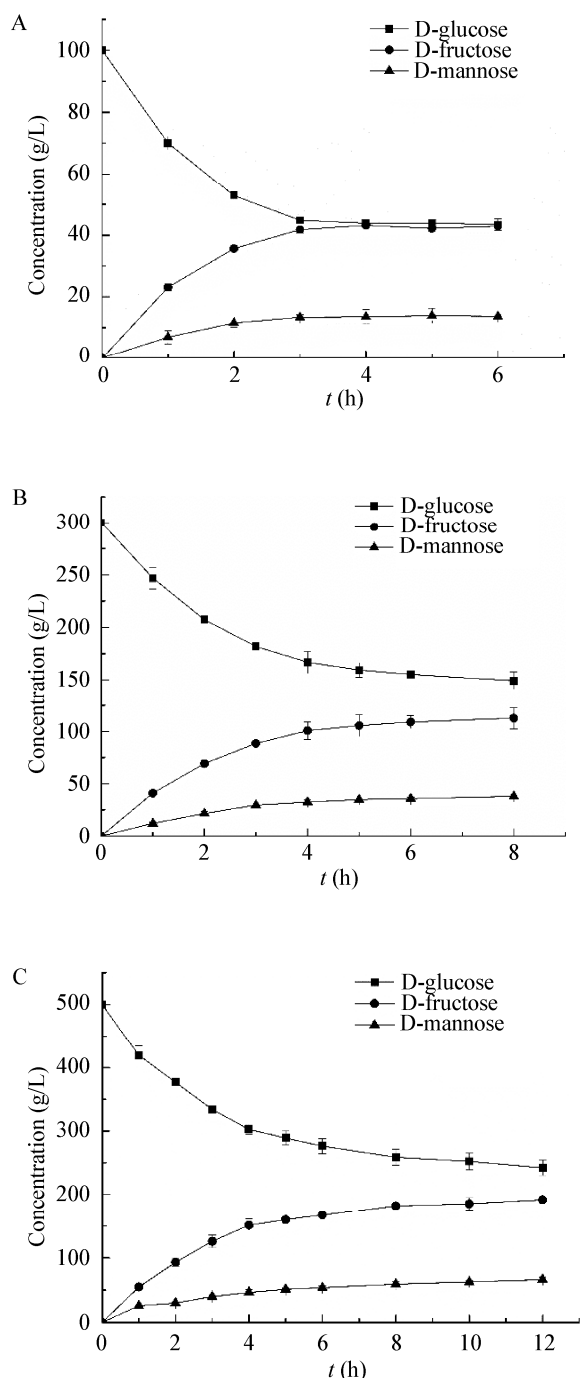


图7 共表达大肠杆菌细胞以D-葡萄糖为底物生产D-甘露糖

Figure 7 The production of D-mannose from D-glucose substrate by co-expression *E. coli* cells

注: A: 100 g/L D-葡萄糖; B: 300 g/L D-葡萄糖; C: 500 g/L D-葡萄糖.

Note: A: 100 g/L of D-glucose; B: 300 g/L of D-glucose; C: 500 g/L of D-glucose.

大多数的文献报道^[14-18,27]是以D-果糖或D-葡萄糖为底物生产D-甘露糖,如表2所示,D-Liase和D-Miase可以将D-果糖直接转化为D-甘露糖。例如,来源于*Thermosediminibacter oceani*的重组D-Liase,在pH 6.5和65℃以及1 mmol/L Mn^{2+} 存在下,以400 g/L D-果糖为底物反应9 h后得到质量浓度为101.6 g/L的D-甘露糖,转化率为25.4%^[14];固定化来自*Agrobacterium radiobacter*的D-Miase反应含200 g/L D-果糖底物溶液,在pH 6.5和55℃条件下反应14 d,可以从180 mL的流出液中得到9 g的D-甘露糖^[27]。尽管以D-果糖为底物生产D-甘露糖有相对较高的转化率,但底物D-果糖价格略高于D-葡萄糖,无形中增加了企业的生产成本。另外,还有文献报道来源于*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*的CEase可将D-葡萄糖直接转化为D-甘露糖,以500 g/L D-葡萄糖为底物,在pH 7.5和75℃条件下,发酵3 h产生75 g/L的D-甘露糖和47.5 g/L的D-果糖,D-葡萄糖、D-果糖和D-甘露糖的平衡比约为75.5:9.5:15,生成D-甘露糖的转化率约为15%^[17]。

另外,有研究者运用双酶系统从D-葡萄糖直接生产D-甘露糖。例如,将来源*Pseudomonas* sp.的D-Miase和来源*Streptomyces* sp.的D-Giase加入到300 g/L D-葡萄糖的反应体系中,D-Giase可以将D-葡萄糖转化为D-果糖,D-Miase进一步将生成的D-果糖催化生成D-甘露糖,反应40 h后,得到114 g/L的D-果糖和36 g/L的D-甘露糖,D-葡萄糖、D-果糖和D-甘露糖的平衡比约为50:38:12,生成D-甘露糖的转化率约为12%^[16]。

相较而言,本研究是在同一细胞中共表达D-Giase和D-Liase,以D-葡萄糖为底物一锅法生产D-甘露糖,不但简化了酶的纯化过程、节省了制备酶的时间和成本,同时,一锅法生产减少了分批发酵的过程,提高了效率。为了提高共表达体系酶的催化效率,合适的pH、温度和反应系统中金属离子的存在起到了至关重要的作用。另外,尽管D-Liase可以将D-果糖转化为D-甘露糖,但是其最适底物是D-来苏糖。因此,将来的研究可使用通过

表 2 酶转化生产 D-甘露糖的方法

Table 2 Enzymatic-conversion approaches for D-mannose production

底物 Substrate	酶 Enzyme	催化剂 Catalyst	条件 Condition	表达菌株 Expressed strain	底物浓度 Substrate concentration (g/L)	转化率 Conversion rate (%)	文献 References
D-果糖	D-MIase	Free enzymes	pH 7.0, 45 °C	<i>B. subtilis</i>	600	25.0	[15]
D-fructose	D-MIase	Immobilized cells	pH 7.5, 55 °C	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	200	25.0	[27]
	D-LIase	Free enzymes	pH 6.5, 65 °C	<i>E. coli</i>	400	25.4	[14]
D-葡萄糖	D-MEase	Free enzymes	pH 8.0, 50 °C	<i>E. coli</i>	500	24.4	[18]
D-glucose	CEase	Free enzymes	pH 7.5, 75 °C	<i>E. coli</i>	500	15.0	[17]
	D-GIase, D-MIase	Free enzymes	pH 7.0, 50 °C	<i>Streptomyces</i> sp.	300	12.0	[16]
				<i>Pseudomonas</i> sp.			
	D-GIase, D-LIase	Free cells	pH 6.0, 70 °C	<i>E. coli</i>	100	13.8	本文 This work

定点突变、随机突变和基于晶体结构的定向进化等方法对 D-LIase 进行底物特异性的分子修饰，得到更能满足工业需要的 D-LIase。

3 结论

本文将来自 *A. cellulolyticus* 的 D-GIase 和来自 *P. bacterium* 1109 的 D-LIase，在 *E. coli* BL21(DE3) 细胞中共表达，通过一锅法利用 D-葡萄糖为底物生产 D-甘露糖。带有 pCDFDuet-Acce-DGI/Peba-DLI 重组质粒的大肠杆菌细胞共表达体系最适温度为 70 °C，在磷酸盐缓冲液(50 mmol/L，pH 6.0)中添加 1 mmol/L Co²⁺时显示出最大活性。在最佳条件下，该反应系统可转化 100 g/L 的 D-葡萄糖产生 13.8 g/L 的 D-甘露糖。在达到反应平衡后，D-葡萄糖、D-果糖和 D-甘露糖的平衡比约为 50:37.5:12.5。总而言之，本文鉴定的一锅法利用 D-葡萄糖生产 D-甘露糖，在工业生产 D-甘露糖中有很大的应用前景。

REFERENCES

[1] Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001[J]. JAMA-Journal of the American Medical Association, 2003, 289(1): 76-79

[2] Zhang WL, Zhang T, Jiang B, et al. Enzymatic approaches to rare sugar production[J]. Biotechnology Advances, 2017, 35(2): 267-274

[3] Huang JW, Chen ZW, Zhang WL, et al. D-lyxose isomerase and its application for functional sugar production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(5):

2051-2062

[4] Moskowitz HR. Ratio scales of sugar sweetness[J]. Perception & Psychophysics, 1970, 7(5): 315-320

[5] Pohl JB, Baldwin BA, Dinh BL, et al. Ethanol preference in *Drosophila melanogaster* is driven by its caloric value[J]. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 2012, 36(11): 1903-1912

[6] Hu X, Shi YN, Zhang P, et al. D-mannose: properties, production, and applications: an overview[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016, 15(4): 773-785

[7] Chen FE, Zhao JF, Xiong FJ, et al. An improved synthesis of a key intermediate for (+)-biotin from D-mannose[J]. Carbohydrate Research, 2007, 342(16): 2461-2464

[8] El-Nakkady SS, Hanna MM, Roaiah HM, et al. Synthesis, molecular docking study and antitumor activity of novel 2-phenylindole derivatives[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 47(1): 387-398

[9] Ranta K, Nieminen K, Ekholm FS, et al. Evaluation of immunostimulatory activities of synthetic mannose-containing structures mimicking the β-(1→2)-linked cell wall mannans of *Candida albicans*[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2012, 19(11): 1889-1893

[10] Saha BC, Racine FM. Biotechnological production of mannitol and its applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 879-891

[11] Fan SP, Jiang LQ, Chia CH, et al. High yield production of sugars from deproteinated palm kernel cake under microwave irradiation via dilute sulfuric acid hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2014, 153: 69-78

[12] Zhang W, Zhang CH, Liang GX. Study on increasing yield of mannose from glucose by epimerization conversion[J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2017, 46(3): 18-21 (in Chinese)

张伟, 章朝晖, 梁光兴. 提高葡萄糖差向异构转化生成甘

- 露糖收率的研究[J]. 化工技术与开发, 2017, 46(3): 18-21
- [13] Park CS, Yeom SJ, Lim YR, et al. Substrate specificity of a recombinant D-lyxose isomerase from *Serratia proteamaculans* that produces D-lyxose and D-mannose[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(3): 343-350
- [14] Yu L, Zhang WL, Zhang T, et al. Efficient biotransformation of D-fructose to D-mannose by a thermostable D-lyxose isomerase from *Thermosediminibacter oceani*[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(12): 2026-2033
- [15] Hu X, Zhang P, Miao M, et al. Development of a recombinant D-mannose isomerase and its characterizations for D-mannose synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 328-335
- [16] Takasaki Y, Hinoki K, Kataoka Y, et al. Enzymatic production of D-mannose from D-fructose by mannose isomerase[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76(3): 237-239
- [17] Park CS, Kim JE, Choi JG, et al. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and its application in the production of mannose from glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(6): 1187-1196
- [18] Saburi W, Sato S, Hashiguchi S, et al. Enzymatic characteristics of D-mannose 2-epimerase, a new member of the acylglucosamine 2-epimerase superfamily[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6559-6570
- [19] Patel DH, Wi SG, Lee SG, et al. Substrate specificity of the *Bacillus licheniformis* lyxose isomerase YdaE and its application in *in vitro* catalysis for bioproduction of lyxose and glucose by two-step isomerization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(10): 3343-3350
- [20] Zhang WL, Li H, Jiang B, et al. Production of D-allulose from D-glucose by *Escherichia coli* transformant cells co-expressing D-glucose isomerase and D-psicose 3-epimerase genes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(10): 3420-3426
- [21] Mu WM, Wang XL, Xue QH, et al. Characterization of a thermostable glucose isomerase with an acidic pH optimum from *Acidothermus cellulolyticus*[J]. Food Research International, 2012, 47(2): 364-367
- [22] Huang JW, Shi Y, Zhang WL, et al. Characterization of recombinant D-Lyxose isomerase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(1): 83-92 (in Chinese) 黄嘉苇, 施悦, 张文立, 等. D-来苏糖异构酶的酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(1): 83-92
- [23] Men Y, Zhu YM, Zeng Y, et al. Co-expression of D-glucose isomerase and D-psicose 3-epimerase: development of an efficient one-step production of D-psicose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2014, 64-65: 1-5
- [24] Wu H, Cheng XB, Zhu YF, et al. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 125(1): 46-51
- [25] Wagner N, Bosshart A, Failmezger J, et al. A separation-integrated cascade reaction to overcome thermodynamic limitations in rare-sugar synthesis[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(14): 4182-4186
- [26] Guo XH, Lv LJ, Bai P. Preparation of D-fructose and D-mannose isomerized from D-glucose: CN, 201310743577.7[P]. 2015-07-01 (in Chinese) 郭翔海, 吕灵娟, 白鹏. 由 D-葡萄糖异构化制备 D-果糖和 D-甘露糖的方法: 中国, 201310743577.7[P]. 2015-07-01
- [27] Hirose J, Kinoshita Y, Fukuyama S, et al. Continuous isomerization of D-fructose to D-mannose by immobilized *Agrobacterium radiobacter* cells[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(4): 349-352