

蔗糖异构酶 PalI 在解脂耶氏酵母中的表面展示

吴琦[#], 黄思敏[#], 郭小宇^{*}, 李宪臻, 刘家豪, 陈慧玲, 李思彭

大连工业大学生物工程学院微生物资源与催化实验室, 辽宁 大连 116033

吴琦, 黄思敏, 郭小宇, 李宪臻, 刘家豪, 陈慧玲, 李思彭. 蔗糖异构酶 PalI 在解脂耶氏酵母中的表面展示[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3094-3106

Wu Qi, Huang Simin, Guo Xiaoyu, Li Xianzhen, Liu Jiahao, Chen Huiling, Li Sipeng. Effective surface display of sucrose isomerase PalI on the cells of *Yarrowia lipolytica*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3094-3106

摘要:【背景】蔗糖异构酶(PalI)生物转化蔗糖是目前生产异麦芽酮糖的主要方法,但在生产过程中存在的蔗糖异构酶转化蔗糖副产物比例较高、游离酶需要分离纯化等问题限制了异麦芽酮糖工业生产的应用。【目的】构建蔗糖异构酶 PalI 在解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*) Po1g 中的表面展示菌株,以降低蔗糖异构酶转化蔗糖的副产物比例及其纯化成本。【方法】为获得具有生产 PalI 能力的 *Y. lipolytica* Po1g 表面展示菌株,通过重叠延伸 PCR 将克雷伯氏菌(*Klebsiella singaporensis*) LX3 的 PalI 的编码基因 *Pall* 与全基因合成的来自 *Y. lipolytica* 细胞壁的锚定蛋白 *Pir1* 融合,转入 *Y. lipolytica* Po1g 中构建表面展示菌株。利用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)比色定糖法测定表面展示的 PalI 酶活力并对其酶学性质进行探究,通过高效液相色谱法分析其转化蔗糖的产物。【结果】构建了蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g,经 DNS 法测得展示在 *Y. lipolytica* Po1g 表面的 PalI 酶活力为(4 694.6±56.6) U/g-菌体干重(dry cell weight, DCW),该酶的最适反应温度及 pH 值分别为 45 °C 和 pH 6.0,在 20–55 °C, pH 3.5–9.0 区间内较稳定。对该酶转化蔗糖产物进行分析,结果表明以异麦芽酮糖为主的二糖产物与单糖副产物的比例可达到 91:9。【结论】本研究构建了表面展示 PalI 的 *Y. lipolytica* Po1g 菌株,为异麦芽酮糖的工业化生产奠定了基础。

关键词: 蔗糖异构酶; 解脂耶氏酵母; 表面展示系统; 酵母细胞壁锚定蛋白 Pir1; 酶学性质

基金项目: 国家自然科学基金(31771907)

#对本文贡献相同

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31771907)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: xiaoguo1987214@126.com

Received: 2021-12-07; Accepted: 2022-03-24; Published online: 2022-04-26

Effective surface display of sucrose isomerase PalI on the cells of *Yarrowia lipolytica*

WU Qi[#], HUANG Simin[#], GUO Xiaoyu^{*}, LI Xianzhen, LIU Jiahao, CHEN Huiling, LI Sipeng

Laboratory of Microbial Resources and Catalysis, School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116033, Liaoning, China

Abstract: [Background] Bioconversion via sucrose isomerase (PalI) is currently a preferred method to produce isomaltulose. However, this method still has some shortcomings, such as the formation of multiple products and the tedious purification process of PalI from cell extracts. [Objective] We sought to achieve efficient isomaltulose production via constructing a surface display strain for PalI on *Y. lipolytica* Po1g and reduce the proportion of by-products and purification cost. [Methods] The gene *Pall* encoding sucrose isomerase PalI from *Klebsiella singaporensis* LX3 was fused with the gene *Pir1* encoding the anchoring protein Pir1 from the yeast cell wall by overlap extension PCR. The fused gene was then transferred into *Y. lipolytica* Po1g for the surface display of PalI. The enzymatic properties of the surface-displayed PalI were investigated via colorimetry with 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), and the products of sucrose conversion were detected by high performance liquid chromatography. [Results] The PalI surface display strain *Pir1-Pall*/Po1g was successfully constructed, and the highest activity of the displayed PalI reached (4 694.6±56.6) U/g of dry cell weight. The displayed PalI was stable at a broad range of 20–55 °C and pH 3.5–9.0, with the best performance at pH 6.0 and 45 °C. Moreover, the displayed PalI led to significantly lower proportion of monosaccharide by-products during the bioconversion process than the free PalI. [Conclusion] Using *Y. lipolytica* Po1g as the host, we constructed a recombinant strain for the surface display of PalI, which provided a basis for the industrial production of isomaltulose.

Keywords: sucrose isomerase; *Yarrowia lipolytica*; surface display system; yeast cell wall-anchoring protein Pir1; enzymatic properties

异麦芽酮糖俗称棕榈糖是由 D-葡萄糖和 D-果糖通过 α -1,6-糖苷键连接而成的蔗糖的异构异构体^[1-2]。异麦芽酮糖具有与蔗糖相似的物理和感官特性,但又具有优于蔗糖的生理功能,如异麦芽酮糖是非致龋性的且消化速度慢、能量释放时间长、不会显著提高胰岛素水平及血糖指数等,因此被广泛用作功能性甜味剂^[1-4]。由于异麦芽酮糖在工业中具有广泛的应用前景,寻求一种高效经济的方式来生产异麦芽酮糖是人们一直以来的研究热点^[3]。目前,异

麦芽酮糖的生产主要是通过蔗糖异构酶 (EC5.4.99.11)转化蔗糖实现。利用蔗糖异构酶转化蔗糖生产异麦芽酮糖现阶段主要有 2 种方式:(1) 利用微生物异源表达的蔗糖异构酶转化蔗糖,例如利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB800 表达来自克雷伯氏菌(*Klebsiella singaporensis*) LX3 的蔗糖异构酶转化蔗糖产生异麦芽酮糖^[5],利用大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21/pET22b-sim 表达土壤分散泛菌(*Pantoea dispersa*) UQ68J 的蔗糖异构酶(PdSIase)转化蔗

糖产生异麦芽酮糖^[6]等；(2) 采用固定化技术将蔗糖异构酶进行固定化后再转化蔗糖产生异麦芽酮糖。酶的固定化技术分为 2 种：(1) 通过物理吸附或者材料包埋的方式将酶进行固定化，例如以硅藻土吸附法与微胶囊包埋法 2 种方法对欧文氏菌(*Erwinia* sp.) D12 来源的蔗糖异构酶进行固定化^[7]；(2) 细胞固定化，主要通过细胞表面展示(cell-surface display)技术完成，例如利用解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)展示来自 *P. dispersa* UQ68J 的蔗糖异构酶等^[3]。

细胞表面展示是一种经济、高效的蛋白质工程技术，其通过将目的蛋白的编码基因与合适的蛋白锚定基序融合，可以在单个宿主菌中完成基因的表达、酶的固定化及蛋白质的纯化，从而降低蛋白纯化所需成本^[8]。根据表达宿主的不同，锚定蛋白的选择也是多种多样的，例如：在 *B. subtilis* 表面利用外孢子皮蛋白(CotX)展示 L-阿拉伯糖异构酶及蔗糖异构酶^[9]等；在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) BY4741 中通过 3 种不同的锚定蛋白(Sag1p、Sed1p 和 Cwp2p)展示 β -葡萄糖苷酶^[10]；在 *Y. lipolytica* 中通过一段功能未知的蛋白(YALI0F24255p)在细胞表面展示大豆表皮过氧化氢酶^[11]。

解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)是公认的适合表面展示的菌株之一，被归类为“普遍公认的安全(generally recognized as safe, GRAS)”微生物。其拥有清晰的遗传背景、易于培养和生产成本低廉等特点，可用于从高浓度糖中生产多种食品化合物，例如有机酸及脂类等^[12-14]。据报道，目前已成功在 *Y. lipolytica* 中展示了 α -半乳糖苷酶 II^[15]、脂肪酶^[16]、 β -内酰胺酶^[17]、 β -葡萄糖苷酶^[9]、L-左旋天冬酰胺酶^[18]、蔗糖异构酶等，其中蔗糖异构酶却只成功展示了来自 *P. dispersa*

UQ68J 的蔗糖异构酶，其他来源的并未研究，并且表面展示的蔗糖异构酶仅在 20–40 °C 的温度及 pH 4.0–7.0 区间内较稳定^[2]。

本研究以 *Y. lipolytica* Polg 为表达菌株，利用 *Y. lipolytica* 细胞壁锚定蛋白 Pir1 构建表面展示重组菌，以此将源自 *Klebsiella* sp. LX3 的蔗糖异构酶 PalI 展示在 *Y. lipolytica* Polg 表面。通过对重组菌体展示的蔗糖异构酶催化蔗糖底物产生的产物含量的分析，探索表面展示系统对产物生成的影响及工业上通过转化蔗糖生成异麦芽酮糖减少副产物单糖的应用。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体

克隆菌株大肠杆菌(*E. coli*) DH10B，大连工业大学生物催化技术国家地方联合工程实验室；展示菌株 *Y. lipolytica* Polg 及载体 pYLSC，中国台湾益生生技有限公司；克隆载体 T-vector pMD19 (simple)，宝生物工程(大连)有限公司；携带 *Y. lipolytica* 细胞壁锚定蛋白 Pir1 编码基因的质粒 pUC57-Pir1 由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成；pYLSC-PalI 质粒由大连工业大学生物催化技术国家地方联合工程实验室构建并保存。

1.2 培养基

YPD 液体培养基(pH 4.0)用于解脂耶氏酵母的发酵培养，YPD 培养基使用前按 1:10 加入 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液；LB 液体培养基(pH 7.0)用于大肠杆菌的发酵培养；YNB 固体培养基用于解脂耶氏酵母转化子的筛选^[11]。

1.3 主要试剂

TaKaRa *rTaq*TM DNA Polymerase、PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase、QuickCutTM *Xba* I、QuickCutTM *Sfi* I、QuickCutTM *Dpn* I、T4 DNA Ligase、Protein

Molecular Weight Marker (High, Low)、DNA 片段纯化试剂盒、质粒 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; YLEX Expression Kit, 中国台湾益生生物技术有限公司; 胰蛋白酶、无水葡萄糖、蔗糖、琼脂粉和 Goldview I 核酸染料, 北京鼎国昌盛有限责任公司。

解脂耶氏酵母的培养需添加 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.0); 表面展示的蔗糖异构酶活力的测定采用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 6.0); 表面展示的蔗糖异构酶最适 pH 及 pH 稳定性测定采用 0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸(pH 3.0-6.0)、0.2 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠(pH 6.0-8.0)和 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0-9.0)。

1.4 引物设计及合成

以全基因合成的锚定蛋白 Pir1 编码基因 *Pir1* 序列为模板, 设计扩增锚定蛋白 Pir1 编码基因 *Pir1* 的引物 YIP-SI-SOE₁-F 和 YIP-SI-SOE₁-R; 以 pYLSC-*Pall* 质粒为模板, 设计扩增蔗糖异构酶编码基因 *Pall* 的引物 YIP-SI-

SOE₂-F 和 pYLSC-SI-R。PCR 反应体系(25 μL): 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 14.75 μL, 模板基因(100 μg/μL) 1 μL, 5×PrimerSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.25 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。通过 2 个基因重叠的部分进行重叠延伸 PCR, 获得融合基因。PCR 反应体系(25 μL): *Pir1* 基因片段(100 ng/μL) 与 *Pall* 基因片段(200 ng/μL)各 1 μL, ddH₂O 15.75 μL, 5×PrimerSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL, PrimerSTAR[®] HS DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.25 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 98 °C 30 s, 68 °C 2 min, 共 15 个循环; 68 °C 10 min。引物 PMD-P₁ 和 PMD-P₂ 为 T-vector pMD19 (simple) 亚克隆载体鉴定的通用引物, 引物 6560F 和 6904R 为鉴定表面展示载体的通用引物。实验中用到的所有引物序列如表 1 所示, 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本文中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Primer description
YIP-SI-SOE ₁ -F	<u>CGGCCGTTCTGGCC</u> ATGCTCTTCAAGTCCGCTGCC	Amplification of <i>Pir1</i> gene
YIP-SI-SOE ₁ -R	ctgattcaaggatggtgcACAGTCCTCGAGTTGACGATGG	
YIP-SI-SOE ₂ -F	GTCAACCTCGAGGACTGTgcaccatccttgaatcag	Amplification of <i>Pall</i> gene
pYLSC-SI-R	<u>GCTCTAGATTA</u> <u>ATGGTGGTGGTGGTGGT</u> TCGC	
6560F	GATCCGGCATGCACTGATC	Colony PCR and genome identification
6904R	AACACCGGTGTTGACTCAG	
PMD-P ₁	GGCTTTACTTTATGCT	Colony PCR
PMD-P ₂	ACAGATGCGTAAGGAGA	

注: YIP-SI-SOE₁-F 斜体下划线标注部分为 *Sfi* I 酶切位点, YIP-SI-SOE₁-R 小写区域为与 *Pall* 片段重叠部分; pYLSC-SI-R 斜体下划线部分为 *Xba* I 酶切位点, 双下划线部分为 His 标签编码序列; YIP-SI-SOE₂-F 小写区域为与 *Pir1* 片段重叠部分
 Note: The underlined part of YIP-SI-SOE₁-F in italics is *Sfi* I digestion site, and the lowercase area of YIP-SI-SOE₁-R is the overlap with *Pall* fragment; The italicized underlined part of pYLSC-SI-R is the *Xba* I digestion site, and the double underlined part is the coding sequence of His tag; The small area of YIP-SI-SOE₂-F is the overlap with *Pir1* fragment.

1.5 蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g 的构建

1.5.1 亚克隆载体 pMD19-T-*Pir1-Pall* 的构建

蔗糖异构酶基因 *Pall* 来自克雷伯氏菌 (*Klebsiella* sp.) LX3, 去掉该基因的起始密码子及分泌信号肽序列(大小为 1 710 bp), 并在其末端引入 6×His 标签。送至生工生物工程(上海)股份有限公司经解脂耶氏酵母密码子优化后合成基因 *Pall* (GenBank 登录号为 KJ 452353.1), 全基因合成后克隆至质粒 pYLSC, 由本实验室保存。*Y. lipolytica* 来源的锚定蛋白 *Pir1* 基因 (GenBank 登录号为 AF 336989), 去掉起始密码子和终止子序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成后克隆至载体 pUC57, 获得含锚定蛋白 *Pir1* 基因的载体 pUC57-*Pir1*, 基因大小为 861 bp。

以本实验室保存的 pYLSC-*Pall* 质粒为模板, 通过 PCR 扩增获得编码蔗糖异构酶的基因片段 *Pall*。以含锚定蛋白 *Pir1* 基因的载体 pUC57-*Pir1* 为模板, 通过 PCR 扩增获得锚定蛋白编码基因片段 *Pir1*。通过重叠延伸 PCR 将 2 个基因片段进行重叠延伸获得融合基因片段

Pir1-Pall, 连接方式如图 1 所示。将融合基因片段 *Pir1-Pall* 亚克隆至 T-vector pMD19 (simple) 载体后转化感受态细胞 *E. coli* DH10B, 37 °C 静置培养 16 h, 挑取单菌落, 利用引物 PMD-P₁ 和 PMD-P₂ 进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性亚克隆菌体接入 LB 液体培养基(含 100 μg/mL 氨苄西林抗生素)中, 37 °C、200 r/min 培养过夜后提取质粒, 将质粒送往吉林省库美生物科技有限公司测序, 测序正确的克隆质粒命名为 pMD19-T-*Pir1-Pall*。

1.5.2 蔗糖异构酶表面展示载体 pYLSC-*Pir1-Pall* 的构建

利用酶切连接的方式构建表面展示载体。首先将上述含有融合基因的亚克隆载体 pMD19-T-*Pir1-Pall* 与表面展示载体 pYLSC 分别进行 *Sfi* I 和 *Xba* I 双酶切, 经切胶回收后获得具有相同黏性末端的融合基因片段 *Pir1-Pall* 与表面展示载体 pYLSC, 利用 T4 DNA 连接酶进行连接, 将融合基因插入到强杂合启动子 hp4d 和分泌信号肽(XPR2)下游, 转录终止子 XPR2 上游(质粒构建图谱如图 1 所示), 然后转化入感受态细胞 *E. coli* DH10B, 37 °C 静置培养 16 h, 挑取

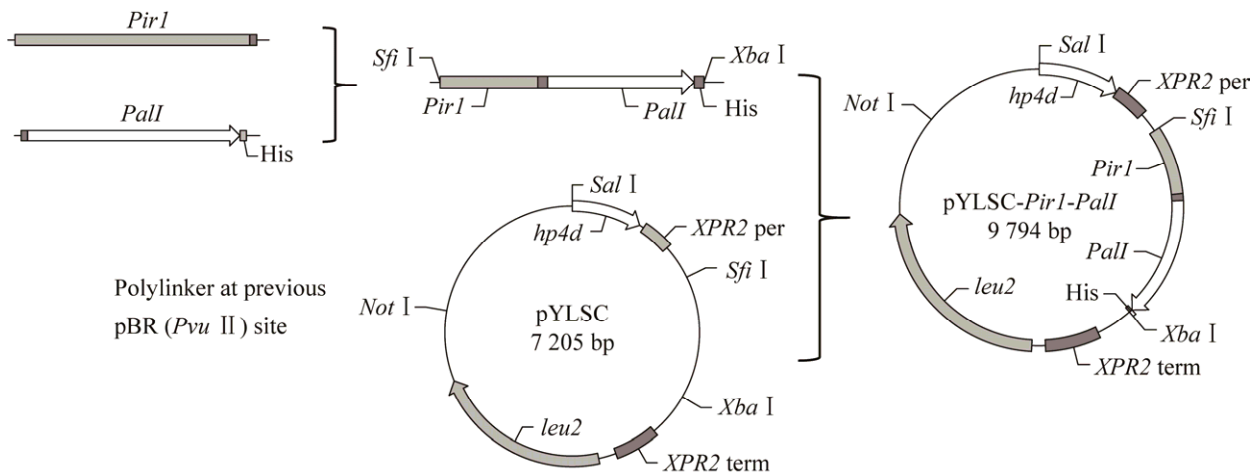


图 1 质粒构建图谱

Figure 1 Plasmid construction map.

单菌落, 利用引物 6560F 和 6904R 进行菌落 PCR 鉴定, 将阳性克隆菌体接入 LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林抗生素)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜后提取质粒, 将质粒送往吉林省库美生物科技有限公司测序, 将测序正确的表面展示载体命名为 pYLSC-*Pir1-PalI*。

1.5.3 蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-PalI/Po1g* 的构建

利用位于 pYLSC 质粒 pBR322 同源序列中的 *Not* I 位点对蔗糖异构酶表面展示载体 pYLSC-*Pir1-PalI* 进行线性化处理, 纯化后的线型 pYLSC-*Pir1-PalI* 载体利用一步法转化入 *Y. lipolytica* Po1g 感受态细胞中, 通过 pBR322 同源序列与 Po1g 基因组发生同源重组, 从而整合进入基因组中。菌株 Po1g 为亮氨酸缺陷型, pYLSC 质粒中的亮氨酸基因(*leu2*)可以使重组菌在缺少亮氨酸的 YNB 培养基中生长, 因此, 经 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 在 YNB 平板中生长的菌落理论上已整合了外源基因片段。为进一步确定目的基因是否重组入 Po1g 基因组中, 挑取单菌落接入 YPD 液体培养基(pH 4.0 并按 1:10 添加 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液)中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养过夜, 提取基因组 DNA, 利用引物 6560F 和 6904R 进行基因组 PCR 鉴定, 以此筛选出阳性克隆菌, 将鉴定正确的阳性克隆菌命名为 *Pir1-PalI/Po1g* 并保存。

1.6 表面展示的蔗糖异构酶的表达

将蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-PalI/Po1g* 进行平板活化, 挑取单一菌落接种至 YPD 液体培养基(pH 4.0)中进行种子培养, 培养基中预先按 1:10 加入 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 进行摇床培养至 OD_{600} 达到 2.0。取 1 mL 种子液, 按 1:50 接入 50 mL 的 YPD 培养基中, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 进行发酵。取 6、12、20、24、48、72、96 和 120 h 的发酵

液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, 以 ddH₂O 清洗菌体 2 次, 然后以 0.5 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液重悬菌体, 制备菌悬液。采用 10% SDS-PAGE 及 Western blotting 对菌悬液进行分析。

1.7 表面展示的蔗糖异构酶活力的检测

分别取 24、48、72 和 96 h 的发酵液 1 mL, 8 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, 以 ddH₂O 清洗菌体 2 次后置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干箱中进行烘干, 直至重量恒定, 测定获得的菌体重量, 即为菌体干重(dry cell weight, DCW), 每组测定 3 个平行样。取上述不同时间的发酵液 8 000 \times g 离心 10 min 收集菌体, 再以 ddH₂O 清洗菌体 2 次后用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液重悬菌体, 制备菌悬液, 将该菌悬液作为 PalI 粗酶液。利用 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) 比色定糖法测定 PalI 粗酶液(表面展示的蔗糖异构酶)的酶活力。

酶活力具体测定方法如下: 取 100 μL 粗酶液(含 0.15 mg 干细胞), 加入 400 μL 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 6.0)配制的 4%蔗糖, 45 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min 后迅速放入水浴锅中沸水浴 15 min 灭活终止酶反应。取 150 μL 反应液加入 200 μL DNS, 在水浴锅中煮沸 5 min, 反应完成后迅速取出, 加入 900 μL ddH₂O, 反复颠倒混匀后取出 200 μL 反应液体, 测定其在 540 nm 处吸光值。以含空载体 pYLSC 的 *Y. lipolytica* Po1g 菌株 pYLSC/Po1g 为阴性对照, 每个反应设置 3 个平行样。根据异麦芽酮糖标准曲线计算产生的还原糖, 并根据酶活力定义计算表面展示的蔗糖异构酶活力。1 个单位的表面展示蔗糖异构酶活力(U)被定义为: 在反应初始阶段, 每分钟释放 1 μmol 异麦芽酮糖的干细胞的质量(DCW)。

1.8 表面展示的蔗糖异构酶酶学性质的分析

1.8.1 表面展示蔗糖异构酶的最适反应温度及热稳定性的测定

取 0.15 mg 发酵菌体即表面展示的蔗糖异构酶重悬于 100 μ L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中, 分别在不同温度条件 (20–60 $^{\circ}$ C) 进行反应, 测定其酶活力, 以确定其最适反应温度, 具体酶活力测定方法见 1.6; 为了测定表面展示的蔗糖异构酶的热稳定性, 将表面展示的蔗糖异构酶在不同温度下温育 10 min 后测定其剩余酶活力。

1.8.2 表面展示蔗糖异构酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性的测定

将 0.15 mg 发酵菌体即表面展示的蔗糖异构酶分别置于不同 pH [0.1 mol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸 (pH 3.0–6.0)、0.2 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠 (pH 6.0–8.0) 及 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 8.0–9.0)], 所有缓冲液均按照标准配方配制^[19]缓冲液中, 在 45 $^{\circ}$ C 条件下测定表面展示蔗糖异构酶酶活力, 以测定其最适反应 pH, 具体酶活力测定方法见 1.6; 为了测定表面展示的蔗糖异构酶的 pH 稳定性, 将表面展示的蔗糖异构酶在不同 pH 条件下室温温育 24 h 后测定其剩余酶活力。

1.9 表面展示的蔗糖异构酶转化蔗糖产物的分析

取 3 mg 发酵菌体即表面展示的蔗糖异构酶重悬于 100 μ L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 6.0) 中, 加入 400 μ L 的 4% 蔗糖溶液, 反应体系为 500 μ L, 45 $^{\circ}$ C 反应 45 min。沸水 15 min 灭活后, 8 000 \times g 离心 10 min 取反应液上清, 采用 HPLC 对转化蔗糖产物进行分析。色谱条件为: 流动相乙腈:水体积比为 80:20, 柱温为 35 $^{\circ}$ C, 进样量为 10 μ L, 流速为 1 mL/min, 洗脱时间为 20 min, 每个样品制备 3 个平行样。

2 结果与分析

2.1 蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g 的构建结果

2.1.1 蔗糖异构酶表面展示载体 pYLSC-*Pir1-Pall* 的构建结果

通过重叠延伸 PCR 将锚定蛋白编码基因 *Pir1* (861 bp) 与蔗糖异构酶编码基因 *Pall* (末端带有 6 \times His 标签, 片段大小为 1 728 bp) 进行融合, 获得大小为 2 589 bp 的融合基因片段 *Pir1-Pall*, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 测定结果与预期条带大小一致, 融合基因扩增成功。使用胶回收试剂盒回收 *Pir1-Pall* 基因片段, 将该片段亚克隆至载体 T-vector pMD19 (simple), 转化至大肠杆菌 *E. coli* DH10B 感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C 静置培养 16 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定。目的条带理论大小为 2 978 bp, 菌落 PCR 产物经核酸电泳验证, 条带大小与预期大小符合。将阳性克隆菌体接入 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 提取质粒送往吉林省库美生物科技有限公司测序, 测序结果显示与目的基因序列完全一致, 说明亚克隆载体构建成功, 将其命名为 pMD19-T-*Pir1-Pall*。将亚克隆载体 pMD19-T-*Pir1-Pall* 与表面展示载体 pYLSC 分别进行 *Sfi* I 和 *Xba* I 双酶切, 利用 T4 DNA 连接酶将 2 个含有相同黏性末端的片段进行连接, 然后转化到 *E. coli* DH10B 感受态细胞中, 并于 LB (Amp 抗性) 平板 37 $^{\circ}$ C 静置培养过夜, 随机挑取平板上的 10 个单菌落进行菌落 PCR 鉴定。目的条带理论大小为 2 978 bp, 菌落 PCR 产物经核酸电泳验证, 条带大小与预期大小符合。提取菌落 PCR 鉴定正确的克隆菌株的质粒, 并将其送往吉林省库美生物科技有限公司测序, 测序结果显示, 其与目的基因序列完全一致, 说明成功构建了表面展示载体,

将其命名为 pYLSC-*Pir1-Pall*。

2.1.2 蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g 的构建结果

蔗糖异构酶表面展示载体 pYLSC-*Pir1-Pall* 经 *Not* I 线性化处理转入 *Y. lipolytica* Po1g 感受态细胞中, 从 YNB 平板上挑取 6 个单菌落接入 YPD 液体培养基, 于 30 °C、200 r/min 培养 18–20 h 后, 提取基因组 DNA 进行 PCR 验证。基因组 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。目的条带理论大小为 2 978 bp, PCR 产物经核酸电泳验证, 条带大小与预期大小相符合。说明成功获得 *Y. lipolytica* 表面展示蔗糖异构酶重组菌株, 命名为 *Pir1-Pall*/Po1g。

2.2 表面展示的蔗糖异构酶的表达结果

将成功构建的蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g 接入发酵液进行 30 °C、200 r/min 摇床培养发酵, 对发酵液进行 6、12、20、24、48、72、96 和 120 h 定时取样, 通过 10% SDS-PAGE 及 Western blotting 测定上述培养时间下蔗糖异构酶在 *Y. lipolytica* 表面的展示情况。SDS-PAGE 测定结果如图 2 所示, 图 2 中黑色箭头所示条带大小在目的蛋白 99.20 kDa 的理论值大小范围内, 随着培养时间的延长, 目的蛋白的表达量增加, 直到 72 h 达到最大, 继续发酵目的蛋白的表达量无明显变化。Western blotting 测定结果如图 3 所示, 图 3 中黑色箭头所示条带大小在目的蛋白 99.20 kDa 的理论值大小范围内, 这与 SDS-PAGE 的测定结果一致, 说明蔗糖异构酶在 *Y. lipolytica* 表面成功展示。

2.3 表面展示的蔗糖异构酶酶活力的测定结果

将成功构建的蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall*/Po1g 接入发酵液进行 30 °C、200 r/min 摇床培养发酵, 对发酵液进行定时取样, 测定 24、48、72 和 96 h 发酵菌体即表面展示的蔗糖

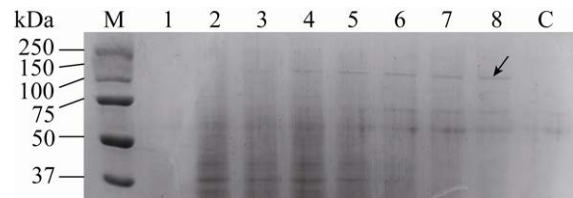


图 2 培养 6、12、20、24、48、72、96 和 120 h 表面展示的蔗糖异构酶 SDS-PAGE 电泳图 M: Marker; 1–8: 6、12、20、24、48、72、96、120 h 蔗糖异构酶表面展示菌体; C: 阴性对照; 箭头所示条带大小与目的条带相近

Figure 2 SDS-PAGE electropherogram of surface displayed sucrose isomerase at 6, 12, 20, 24, 48, 72, 96, and 120 h of incubation. M: Protein marker; 1–8: 6, 12, 20, 24, 48, 72, 96, 120 h sucrose isomerase surface display cell; C: Negative control; The size of the band indicated by the arrow is similar to the target band.

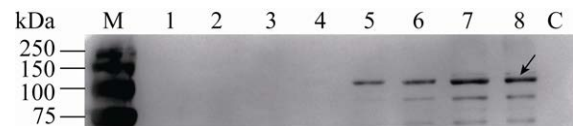


图 3 培养 6、12、20、24、48、72、96 和 120 h 表面展示的蔗糖异构酶 Western blotting 电泳图 M: Marker; 1–8: 6、12、20、24、48、72、96 和 120 h 蔗糖异构酶表面展示菌体; C: 阴性对照; 箭头所示条带大小与目的条带相近

Figure 3 Western blotting electropherogram of surface displayed sucrose isomerase at 6, 12, 20, 24, 48, 72, 96, and 120 h of incubation. M: Protein marker; 1–8: 6, 12, 20, 24, 48, 72, 96, 120 h sucrose isomerase surface display cell; C: Negative control; The size of the band indicated by the arrow is similar to the target band.

异构酶酶活力, 测定结果如图 4 所示。随着培养时间的增加, 蔗糖异构酶表面展示菌体酶活力逐渐增大直至平稳, 而且最大酶活力出现在 72 h, 达到 1 291.81 U/g-DCW, 继续发酵酶活力值不发生变化, 后续选取 72 h 发酵菌体进行酶活力测定。

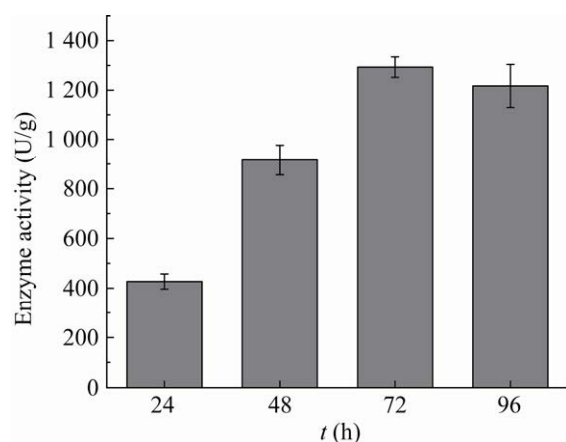


图 4 蔗糖异构酶表面展示菌株 *Pir1-Pall/Polg* 24、48、72 和 96 h 发酵菌体酶活力测定结果柱状图

Figure 4 Histogram of enzyme activity of sucrose isomerase surface display strain *Pir1-Pall/Polg* fermented for 24, 48, 72 and 96 h.

2.4 表面展示的蔗糖异构酶的酶学性质的分析

2.4.1 表面展示蔗糖异构酶的最适反应温度及温度稳定性的测定结果

以 4%蔗糖为底物, 在不同温度条件下测定

表面展示蔗糖异构酶酶活力。测定结果如图 5A 所示, 当反应温度达到 50 °C 时, 酶活力值达到最高, 并且当温度处于 40–45 °C 时, 酶活力无明显变化。然而随着温度的继续升高, 酶活力逐渐降低, 在 60 °C 时几乎完全失活。将该酶在不同温度下保温 10 min 后测定其剩余酶活力, 测定结果如图 5B 所示, 在 20–45 °C 孵育 10 min 后, 剩余酶活力仍保留 85% 以上; 当温度升至 55 °C 时酶活力迅速下降, 但依然能保持在 60%; 当温度进一步升高到 60 °C 时已经很难检测到活性, 这说明表面展示蔗糖异构酶在 55 °C 以内有良好的稳定性。

2.4.2 表面展示蔗糖异构酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性的测定结果

以 4%蔗糖为底物, 在不同 pH 条件下测定表面展示蔗糖异构酶酶活力。测定结果如图 6A 所示, 最适反应 pH 值为 6.0, pH 值小于 4.5 或者大于 8.0 时, 酶活力大幅度降低。将该酶在不同 pH 下室温孵育 24 h 后测定其 pH 稳定性, 测定结果如图 6B 所示。在 pH 4.5–9.0 孵育 24 h

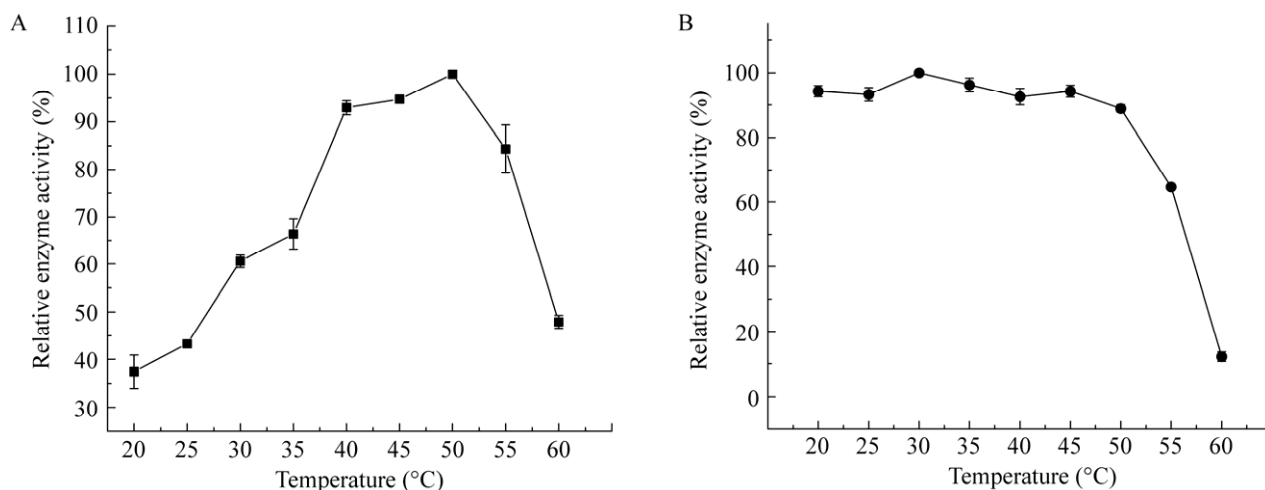


图 5 温度对表面展示的蔗糖异构酶酶活力的影响及蔗糖异构酶温度稳定性的测定 A: 最适温度; B: 温度耐受性测定

Figure 5 Effect of temperature on enzyme activity and determination of temperature tolerance of sucrose isomerase on surface. A: Optimum temperature; B: Determination of temperature stability.

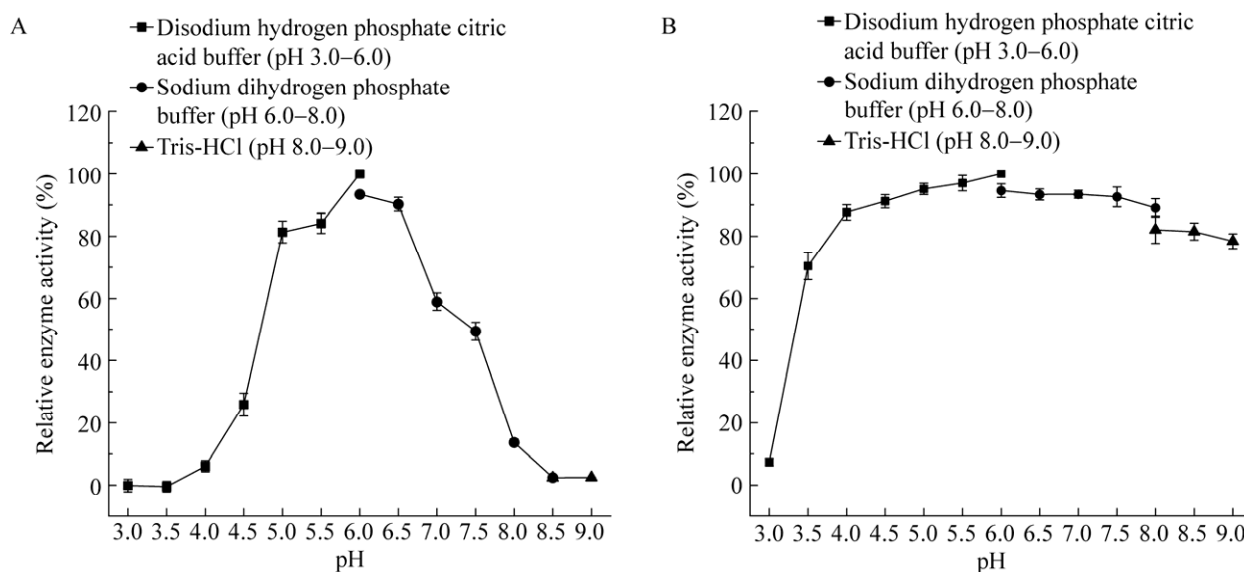


图 6 pH 对表面展示蔗糖异构酶酶活力的影响及表面展示蔗糖异构酶的 pH 稳定性测定 A: 最适 pH; B: pH 稳定性测定

Figure 6 Effect of pH on enzyme activity and determination of pH tolerance of sucrose isomerase on surface. A: Optimum pH; B: Determination of pH stability.

后, 剩余酶活力仍保留 80%以上; 在 pH 值小于 4.0 时, 酶活力迅速下降; pH 值为 3.0 时已经很难检测到活性, 说明该酶具有较宽的 pH 稳定区间。

2.5 表面展示蔗糖异构酶转化蔗糖产物的分析

通过 HPLC 分析蔗糖异构酶转化蔗糖的产物中各组分占比, 以在 *Y. lipolytica* Po1g 中外泌表达游离的蔗糖异构酶为阴性对照。测定结果如图 7 所示, 蔗糖转化产物主要是异麦芽酮糖和海藻酮糖, 但伴随单糖副产物葡萄糖及果糖的生成。根据标准品(1%异麦芽酮糖, 1%海藻酮糖, 1%葡萄糖, 1%果糖)的出峰时间确定样品中的各个组分的出峰时间。分别取浓度为 0.01%–5.00%的标准品进行 HPLC, 以标准品浓度为横坐标、以峰面积为纵坐标绘制不同标准品的标准曲线, 将转化产物中的不同组分的峰面积代入标准曲线, 计算得出转化产物中各组

分的具体生成量, 并计算其在总产物中的占比, 测定结果如图 8 所示。与游离蔗糖异构酶相比, 表面展示的蔗糖异构酶转化蔗糖产物中异麦芽酮糖的含量由 36.29%提高到了 77.01%±1.77%, 为(13.86±0.08) mmol/L; 而海藻酮糖、果糖及葡萄糖在产物中的占比较低, 分别为 15.17%±0.06%、3.21%±0.67%及 4.61%±1.03%。这说明展示于 *Y. lipolytica* Po1g 表面的蔗糖异构酶转化蔗糖产物中的单糖比例较游离的酶有了明显的降低。

3 讨论

本研究构建了一个蔗糖异构酶表面展示系统, 该系统中展示于 *Y. lipolytica* Po1g 表面的蔗糖异构酶转化蔗糖的产物异麦芽酮糖的含量较该酶的游离状态下有显著提高, 异麦芽酮糖含量由 36.29%提高至 77.01%±1.77%。这种产物比例的差别可能是由于酶活性位点附近空间结构的变化造成的。以往报道表明, 利用 Pir1

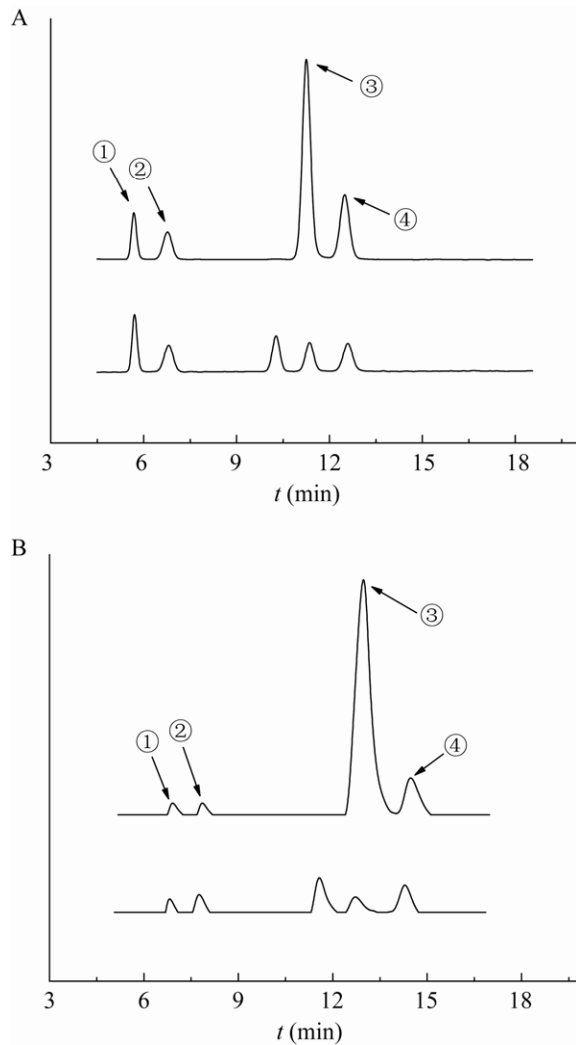


图 7 表面展示的蔗糖异构酶转化蔗糖产物 HPLC 分析 A: *Y. lipolytica* Polg 表达的游离态蔗糖异构酶转化蔗糖产物 HPLC 分析结果; B: *Y. lipolytica* Polg 表面展示的蔗糖异构酶转化蔗糖产物 HPLC 分析结果。①: 果糖; ②: 葡萄糖; ③: 异麦芽酮糖; ④: 海藻酮糖

Figure 7 HPLC analysis of sucrose isomerase transformed sucrose products displayed on the surface. A: HPLC analysis results of sucrose products transformed by free sucrose isomerase expressed by *Y. lipolytica* Polg; B: HPLC analysis results of sucrose isomerase transformed sucrose products displayed on the surface of *Y. lipolytica* Polg. ①: Fructose; ②: Glucose; ③: Isomaltulose; ④: Trehalulose.

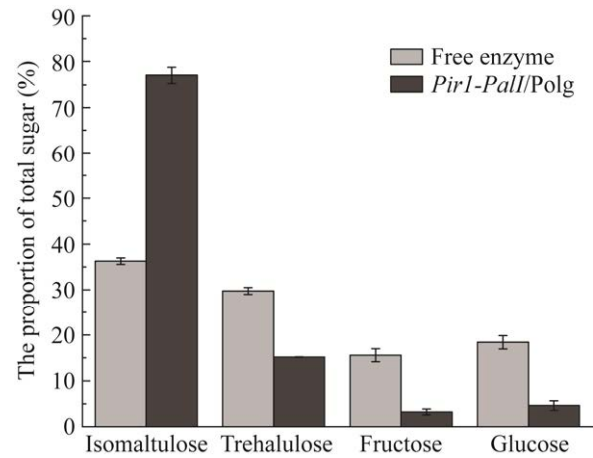


图 8 蔗糖异构酶转化蔗糖产物中各组分占比
Figure 8 Proportion of components in sucrose isomerase transformed sucrose products.

在 *S. cerevisiae* 表面展示糖基转移酶的展示系统中, 酶的分布不规则^[17]。因此, 本研究采用的展示系统可能是由于锚定蛋白 Pir1 在细胞壁上的不规则分布, 导致与其共表达的蔗糖异构酶在细胞壁上的不规则分布, 直接影响到其与底物的作用^[20], 最终导致表面展示的蔗糖异构酶转化蔗糖的产物中各个组分的占比发生变化。另外, 本研究中蔗糖异构酶在其来源菌中表达时, 其酶的产物组成比例与酶的表达场所有关, 其中以胞壁酶催化形成的葡萄糖与果糖产物比例最低^[20]。因此, 将其进行表面展示有助于降低其单糖产物的形成, 与上述因素共同作用改变了蔗糖异构酶转化产物的比例。

本研究中展示在 *Y. lipolytica* Polg 表面的蔗糖异构酶与其他表达菌株中表达的重组蔗糖异构酶相比, 蔗糖异构酶的温度耐受性及 pH 耐受性都得到了提高, 在 pH 4.5–9.0 条件下孵育 24 h 后剩余酶活力仍保留 80%, 并且能在 20–55 °C 环境下保持酶活力相对稳定。来自 *Erwinia* sp. 的蔗糖异构酶在 pH 5.0–7.0 及温度处于 30 °C 以下时才较稳定^[3]; *Erwinia* sp. D12

产生的蔗糖异构酶在 pH 5.7–6.3 及 5 °C 条件下只能在 24 h 内保持酶活力稳定^[21]; *Klebsiella* sp. 18 中纯化得到的蔗糖异构酶在相同的测定条件和 pH 5.5–6.6 范围内稳定^[22]。稳定性的提高可能是由于展示的酶被锚定在细胞膜上, 而细胞膜稳定了酶的结构, 防止其被蛋白酶水解, 从而获得了较高的 pH 稳定性及温度稳定性。

4 结论

本研究成功构建了蔗糖异构酶的 *Y. lipolytica* Po1g 表面展示菌株 *PirI-PalI/Po1g*, 实现了蔗糖异构酶在 *Y. lipolytica* 细胞表面的固定化。经测定, 表面展示的蔗糖异构酶的最高酶活力为 (4 694.6±56.6) U/g-DCW, 最适反应条件为 45 °C 和 pH 6.0, 在 20–55 °C 及 pH 3.5–9.0 环境下酶活力稳定, 较其他表面展示系统展示的蔗糖异构酶而言, 温度及 pH 稳定性显著提高。转化蔗糖获得异麦芽酮糖的转化率为 77.01%±1.77%, 较分泌表达的蔗糖异构酶及其他表面展示系统展示的蔗糖异构酶而言, 该表面展示的蔗糖异构酶获得了更高的异麦芽酮糖得率及更低的单糖得率。

REFERENCES

- [1] Liu LN, Bilal M, Luo HZ, Zhao YP, Duan XG. Studies on biological production of isomaltulose using sucrose isomerase: current status and future perspectives[J]. *Catalysis Letters*, 2021, 151(7): 1868-1881
- [2] Li LJ, Wang HW, Cheng HR, Deng ZX. Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 32: 208-217
- [3] Contesini FJ, De Oliveira Carvalho P, Grosso CRF, Sato HH. Single-step purification, characterization and immobilization of a sucrose isomerase from *Erwinia* sp.[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2013, 2(4): 322-327
- [4] Mu WM, Li WJ, Wang X, Zhang T, Jiang B. Current studies on sucrose isomerase and biological isomaltulose production using sucrose isomerase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(15): 6569-6582
- [5] 张贺朋, 王兵兵, 李宪臻, 李蓉. 蔗糖异构酶 PalI 在枯草芽孢杆菌中的异源表达及应用[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(8): 923-927
Zhang HP, Wang BB, Li XZ, Li R. Heterologous expression and application of sucrose isomerase PalI in *Bacillus subtilis*[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2021, 34(8): 923-927 (in Chinese)
- [6] 滕菲, 肖华, 王宁鹤, 李玉, 路福平. 蔗糖异构酶突变菌株的构建及其应用研究[J]. *食品研究与开发*, 2015, 36(17): 143-147
Teng F, Xiao H, Wang NH, Li Y, Lu FP. Engineering of mutant sucrose isomerase producing strain and its application[J]. *Food Research and Development*, 2015, 36(17): 143-147 (in Chinese)
- [7] Contesini FJ, Ibarguren C, Grosso CRF, De Oliveira Carvalho P, Sato HH. Immobilization of glucosyltransferase from *Erwinia* sp. using two different techniques[J]. *Journal of Biotechnology*, 2012, 158(3): 137-143
- [8] Dong MS, Li TP, Li SH, Guo J, Gong Y, Qi X. Expression and enzymatic characterization of rice α -galactosidase II displayed on yeast cell surface[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 81: 57-62
- [9] Zhan YJ, Zhu P, Liang JF, Xu Z, Feng XH, Liu Y, Xu H, Li S. Economical production of isomaltulose from agricultural residues in a system with sucrose isomerase displayed on *Bacillus subtilis* spores[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2020, 43(1): 75-84
- [10] 周红, 张阳, 宋育阳, 李莹, 杜青, 张会宁, 刘延琳. 不同启动子及锚定蛋白对酿酒酵母表面展示 β -葡萄糖苷酶活性的影响[J]. *农业生物技术学报*, 2020, 28(10): 1849-1861
Zhou H, Zhang Y, Song YY, Li Y, Du Q, Zhang HN, Liu YL. Effects of different promoters and anchoring proteins on β -glucosidase activity displayed on the surface of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2020, 28(10): 1849-1861 (in Chinese)
- [11] Wang JM, Wang CM, Men X, Yue TQ, Madzak C, Xiang XH, Xiang HY, Zhang HB. Construction of arming *Yarrowia lipolytica* surface-displaying soybean seed coat peroxidase for use as whole-cell biocatalyst[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 135: 109498

- [12] Zhang P, Wang ZP, Sheng J, Zheng Y, Ji XF, Zhou HX, Liu XY, Chi ZM. High and efficient isomaltulose production using an engineered *Yarrowia lipolytica* strain[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265: 577-580
- [13] Wang GY, Zhang Y, Chi Z, Liu GL, Wang ZP, Chi ZM. Role of pyruvate carboxylase in accumulation of intracellular lipid of the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* ACA-DC 50109[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4): 1637-1645
- [14] Li C, Gao S, Yang XF, Lin CSK. Green and sustainable succinic acid production from crude glycerol by engineered *Yarrowia lipolytica* via agricultural residue based *in situ* fibrous bed bioreactor[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 612-619
- [15] Dong MS, Gong Y, Guo J, Ma J, Li SH, Li TP. Optimization of production conditions of rice α -galactosidase II displayed on yeast cell surface[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 171: 105611
- [16] Liu Y, Zhang R, Lian ZS, Wang SH, Wright AT. Yeast cell surface display for lipase whole cell catalyst and its applications[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014, 106: 17-25
- [17] Strauss A, Götz F. *In vivo* immobilization of enzymatically active polypeptides on the cell surface of *Staphylococcus carnosus*[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(3): 491-500
- [18] Lima GM, Effer B, Biasoto HP, Feijoli V, Pessoa A, Palmisano G, Monteiro G. Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 156: 107516
- [19] 刘志国. 生物化学实验[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2007
- Liu ZG. *Biological chemistry experiment*[M]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology Press, 2007. (in Chinese)
- [20] Shimma YI, Saito F, Oosawa F, Jigami Y. Construction of a library of human glycosyltransferases immobilized in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(11): 7003-7012
- [21] Li XZ, Zhang DH, Chen F, Ma J, Dong YH, Zhang LH. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 2131-2136
- [22] Kawaguti HY, Celestino ÉM, Moraes ALL, Yim DK, Yamamoto LK, Sato HH. Characterization of a glucosyltransferase from *Erwinia* sp. D12 and the conversion of sucrose into isomaltulose by immobilized cells[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 48(2): 211-217
- [23] Park YK, Uekane RT, Sato H. Biochemical characterization of a microbial glucosyltransferase that converts sucrose to palatinose[J]. *Revista De Microbiologia*, 1996, 27(2): 131-136