

研究报告

节杆菌(*Arthrobacter* sp.) EpRS66 β -呋喃果糖苷酶
重组表达及酶促合成低聚乳果糖霍润甜^{1,2}, 夏伟^{1,2}, 刘展志^{1,2}, 吴敬^{*1,2}

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122

霍润甜, 夏伟, 刘展志, 吴敬. 节杆菌(*Arthrobacter* sp.) EpRS66 β -呋喃果糖苷酶重组表达及酶促合成低聚乳果糖[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3398-3408.

HUO Runtian, XIA Wei, LIU Zhanzhi, WU Jing. Recombinant expression of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. EpRS66 and enzymatic synthesis of lactosucrose[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3398-3408.

摘要: 【背景】低聚乳果糖是一种新型的功能性低聚糖, 具有改善肠道菌群及提高免疫力等功能, 被应用于食品、饲料等行业, 市场需求量逐年增加。 β -呋喃果糖苷酶对乳糖的受体特异性较高, 工业上常用来制备低聚乳果糖, 但现有酶种转化率较低、生产成本较高。【目的】挖掘新型 β -呋喃果糖苷酶基因, 探究其酶学性质及制备低聚乳果糖的能力。【方法】克隆节杆菌(*Arthrobacter* sp.) EpRS66 的 β -呋喃果糖苷酶基因, 将其在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中重组表达, 研究重组酶的酶学性质, 优化其催化制备低聚乳果糖的反应条件。【结果】重组酶的最适温度为 40 °C, 最适 pH 值为 6.0, 在 pH 5.0–8.0 范围内稳定性良好, 在 40 °C 的半衰期为 20 min。利用重组酶制备低聚乳果糖, 以 15%蔗糖和 15%乳糖为底物, 在 40 °C、pH 6.0 及加酶量 25 μ g/mL 的条件下反应 3 h 后转化率最高达到 32.2%; 而在 30%蔗糖和 30%乳糖的高底物浓度下, 转化率也可达到 30.8%。

【结论】本研究获得了一种能有效催化形成低聚乳果糖的新型 β -呋喃果糖苷酶, 为工业化生产低聚乳果糖提供了新的选择。

关键词: 低聚乳果糖; β -呋喃果糖苷酶; 酶学性质; 酶转化

资助项目: 国家自然科学基金(32101884)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32101884).

*Corresponding author. E-mail: jingwu@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-12-07; Accepted: 2024-01-09; Published online: 2024-03-11

Recombinant expression of β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. EpRS66 and enzymatic synthesis of lactosucrose

HUO Runtian^{1,2}, XIA Wei^{1,2}, LIU Zhanzhi^{1,2}, WU Jing^{*1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Lactosucrose, a novel functional oligosaccharide, has been demonstrated capable of improving the gut microbiota and boosting the immunity of humans and animals. Since it is increasingly utilized in food and feed industries, the market demand for lactosucrose has been increasing year by year. The industrial production of lactosucrose mainly uses β -fructofuranosidases due to the high product specificity. However, the conversion rates of existing enzymes were generally low, which made the production cost remaining high. [Objective] To identify new β -fructofuranosidases for the enzymatic properties and industrial production of lactosucrose. [Methods] We identified a β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* sp. EpRS66 and expressed it in *Escherichia coli*. Furthermore, we characterized the enzymatic properties of the recombinant β -fructofuranosidase and optimized the optimum reaction conditions for the production of lactosucrose. [Results] The recombinant enzyme showed the optimal performance at 40 °C and pH 6.0. It maintained good stability within the range of pH 5.0–8.0 and had a half-life of 20 min at 40 °C. Under the reaction conditions of 40 °C and pH 6.0, the conversion rate of lactosucrose reached 32.2% at the time point of 3 h with substrates of 15% sucrose and 15% lactose and an enzyme addition of 25 μ g/mL. Moreover, with high concentrations of substrates (30% sucrose and 30% lactose), the conversion rate reached 30.8%. [Conclusion] This study provides a novel β -fructofuranosidase that can effectively catalyze the formation of lactosucrose, offering a new choice for industrial production of lactosucrose.

Keywords: lactosucrose; β -fructofuranosidase; enzymatic properties; enzymatic conversion

低聚乳果糖是一种由 β -D-半乳糖苷、 α -D-葡萄糖苷和 β -D-呋喃果糖苷残基组成的三糖，其风味特征类似于蔗糖，甜度约为蔗糖的 30%，是一种天然的甜味剂，具有改善肠道菌群、增强免疫力、促进钙的吸收等功能^[1]。低聚乳果糖热量低、难以被生物体消化和吸收利用，具有抑制脂肪积累、降低胆固醇的功效^[2]，是一种新型的功能性低聚糖，于 2005 年被列入日本特定健康用途食品 (foods for specific health uses, FOSHU)，受到广大消费者

和日化、医药等众多行业的青睐。据 Verified Market Research 公司统计，低聚乳果糖在 2021 年市场规模达到 3.435 亿美元，预计 2023 年到 2030 年期间将以 6.2% 的增长率增长，2030 年将达到 5.902 亿美元^[3-4]。

低聚乳果糖通常以蔗糖和乳糖为底物经酶法途径合成，一种是在 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, EC 3.2.1.23)^[5] 的作用下将乳糖的半乳糖基转移到蔗糖上；另一种是在 β -呋喃果糖苷酶 (β -fructofuranosidase, EC 3.2.1.26)^[6] 或

果聚糖蔗糖酶(levansucrase, EC 2.4.1.10)^[7]的作用下将蔗糖的果糖基转移到乳糖上。使用果聚糖蔗糖酶和 β -半乳糖苷酶制备低聚乳果糖时均易形成不同聚合度的低聚糖。Duarte 等^[5]利用 β -半乳糖苷酶将 600 g/L 的乳糖和蔗糖转化成 227 g/L 的低聚糖, 其中低聚乳果糖仅有 56 g/L。Bahlawan 等^[8]对不同来源的果聚糖蔗糖酶制备低聚乳果糖进行探究, 大多数反应混合物同时富含低聚乳果糖和蔗糖三糖。尽管目前果聚糖蔗糖酶生产低聚乳果糖的转化率较高, 但其产物构成较复杂、后续分离纯化成本较高。

来源于节杆菌(*Arthrobacter* sp.)的 β -呋喃果糖苷酶单独与高浓度蔗糖孵育时, 主要催化水解反应, 而在合适的受体存在下, 则优先催化蔗糖的果糖基向受体分子转移^[9]。该类酶受体底物特异性较高, 乳糖是该类酶催化转糖基反应的最佳受体底物。因此, 在以蔗糖和乳糖为原料制备低聚乳果糖时, 该类酶主要催化低聚乳果糖的合成, 产物组分较单一, 成为低聚乳果糖制备用酶的更优选择^[9]。1990 年, Ito 等^[10]首次使用 *Arthrobacter* sp. K-1 来源的 β -呋喃果糖苷酶在 400 g/L 底物的条件下制备低聚乳果糖, 转化率达到 22.5%。2008 年, 朱桂兰等^[11]对 *Arthrobacter* sp. 10137 来源的 β -呋喃果糖苷酶法合成低聚乳果糖的工艺参数进行优化, 在 400 g/L 底物浓度下, 最大转化率达到 16.1%。2011 年, 廖春龙等^[12]利用 *Arthrobacter* sp. 10138 来源的 β -呋喃果糖苷酶在 pH 7.0、35.0 °C、底物浓度 200 g/L 的条件下, 23 h 时低聚乳果糖转化率为 22.7%。2020 年, Chen 等^[13]将 *Arthrobacter* sp. 10138 来源的 β -呋喃果糖苷酶在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中进行异源表达, 利用 40 μ g/mL 纯酶在底物浓度 300 g/L 的条件下, 低聚乳果糖转化率达到 36%。

目前, 用于制备低聚乳果糖的 β -呋喃果糖

苷酶资源种类较为匮乏, 挖掘新型的 β -呋喃果糖苷酶具有重要意义。基于此, 本研究挖掘来源于 *Arthrobacter* sp. EpRS66 的 β -呋喃果糖苷酶, 将其在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中重组表达, 对纯化后的重组酶进行酶学性质探究, 并评估其低聚乳果糖合成的能力, 以提供新酶资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

Arthrobacter sp. EpRS66 来源的 β -呋喃果糖苷酶(ArFF)基因由安升达(苏州)科技有限公司合成, 并连接至实验室保藏的 pET-24a(+)质粒载体(含 OmpA 信号肽)上。菌株 *E. coli* BL21(DE3)由实验室保藏被用于基因表达。

1.1.2 主要试剂和仪器

低聚乳果糖标品, 上海惠诚生物科技有限公司; 其他化学试剂, 国药集团化学试剂(上海)有限公司。HPLC, 沃特世科技(上海)有限公司; NH2P-50-4E 色谱柱, 力森诺科科学仪器(上海)有限公司; 台式高速离心机, 艾本德股份公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 超级恒温水槽, 上海森信实验仪器有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0。TB 培养基(g/L): 蛋白胨 12.0, 酵母提取物 24.0, 甘油 5.0, 磷酸氢二钾 12.5, 磷酸二氢钾 2.3。

1.2 β -呋喃果糖苷酶的挖掘与鉴定

从 GH68 家族数据库(<http://www.cazy.org>)中检索获得 *Arthrobacter* sp. K-1 菌株的序列(登录号为 BAB72022.1)并作为 query 序列, 通过 BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)搜索查询, 在非冗余蛋白序列数据库中选择序

列,通过 MEGA 7 软件中的 Clustal W 算法中的默认参数对蛋白序列进行比对,采用基于 JTT 矩阵模型的最大似然法构建系统发育树。使用 SWISS-MODEL 网站(<https://swissmodel.expasy.org>)进行蛋白同源建模,利用 AutoDockTools-1.5.6 软件将蛋白与低聚乳糖分子进行分子对接,获得结合能最低的蛋白用于后续表达。使用 SignalP4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽分析。

1.3 重组蛋白的表达与纯化

将含 ArFF 的重组质粒热激转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态中,涂布在含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基,挑取单菌落进行酶切验证,获得重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET-24a(+)-ArFF。将重组菌接种到含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下培养 10–12 h,以 5%的接种量接种至含 100 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 TB 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件下培养 2 h 后,加入终浓度为 0.08 mmol/L IPTG,将温度调至 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导酶的表达。发酵 24 h 后,将发酵液以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 20 min 得到发酵上清,即为粗酶液。取 5 OD_{600} ($OD_{600} \approx 12$) 菌体用生理盐水洗涤,后用磷酸钠缓冲液重悬,用超声破碎仪对细胞进行破碎,离心后上清为胞内上清,细胞碎片为包涵体。发酵上清和胞内上清与 5 \times 蛋白上样缓冲液混合,包涵体与 20 μL 5 \times 蛋白上样缓冲液混合,均在沸水中加热 10 min。按照 SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒说明书配制蛋白胶,发酵上清和胞内上清上样 8 μL ,包涵体上样 3 μL ,进行蛋白凝胶电泳,使用考马斯亮蓝 R-250 染料对蛋白条带染色,脱色后用凝胶成像仪观察条带。

ArFF 的 C 端带有组氨酸标签,使用镍柱亲和和层析纯化该蛋白^[13]。首先使用结合缓冲液 (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4)平衡 Ni-NTA 柱,粗酶液经 0.22 μm 无机膜过滤后低流速上样,使用含有不同浓度咪唑的洗涤缓冲液

(25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 0–300 mmol/L 咪唑, pH 7.4)进行梯度洗脱,通过 SDS-PAGE 分析获得正确的洗脱浓度,最后使用 10 kDa 超滤管进行超滤,使用 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0)进行置换,采用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.4 酶学性质测定

在最适温度和最适 pH 下,向提前预热的 200 μL 含有蔗糖和乳糖(各 20%,质量体积分数)的磷酸钠缓冲液(50 mmol/L)中加入 200 μL 适当稀释的酶液,反应 10 min 后煮沸终止反应。1 单位转果糖基化活性定义为在每分钟生产 1 μmol 低聚乳糖所需的酶量。采用 HPLC 检测糖的浓度:使用示差检测器(35 $^{\circ}\text{C}$)和 NH2P-50-4E 色谱柱进行检测,流动相为 75%乙腈,流速 0.8 mL/min。

分别测定 30、35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$ 下重组酶转果糖基化活性,将最高酶活定义为 100%,确定最适温度。将酶液放置在最适温度处理,每隔 20 min 取样并测定其残留酶活,获得其半衰期。在最适温度下分别测定 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 重组酶转果糖基化活性,将最高酶活定义为 100%,确定最适 pH。将重组酶放置在不同 pH 缓冲液中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 24 h 后测定残留酶活。

1.5 动力学参数的测定

用 20%蔗糖作为糖基供体,配制 10–400 g/L 的乳糖作为受体底物,测定转果糖基化酶活;用 20%乳糖作为糖基受体,配制 10–400 g/L 的蔗糖作为供体底物,测定转果糖基化酶活,确定转苷动力学参数;利用 Origin 软件进行非线性拟合获得 K_m 和 V_{\max} ,结合计算的蛋白浓度最终获得 k_{cat} 值。

1.6 重组酶制备低聚乳糖条件的测定

将 20%蔗糖、20%乳糖、磷酸钠缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.0)、50 $\mu\text{g/mL}$ β -呋喃果糖苷酶于 5 mL 反应液中进行酶转化实验,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴摇床上孵育一定时间取样,煮沸 20 min 终止反

应, 4 °C、12 000 r/min 离心 2 min 后获得上清液。上清液使用 HPLC 方法检测低聚乳果糖浓度, 转化率为低聚乳果糖质量/总糖质量。分别对温度(30、35、40、45 和 50 °C)、pH (4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0)、底物比例(蔗糖:乳糖为 2:1、4:3、1:1、4:5 和 2:3)、底物总浓度(20%、30%、40%、50%、60%和 70%)、加酶量(10、15、20、25、30、40 和 50 $\mu\text{g/mL}$)、时间(0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0 h)进行优化。

2 结果与分析

2.1 来源于 *Arthrobacter* sp. EpRS66 的基因 *ArFF* 的挖掘

为了获得新的 β -呋喃果糖苷酶, 将通过 BLASTp 搜到的与 *Arthrobacter* sp. K-1 β -呋喃果糖苷酶(登录号为 BAB72022.1)序列一致性在

50%以上的部分序列, 与已知 GH68 家族的 β -呋喃果糖苷酶、果聚糖蔗糖酶、菊糖蔗糖酶进行序列比对, 绘制系统发育树, 如图 1 所示。其中 12 条蛋白属于 β -呋喃果糖苷酶, 随后将这 12 条蛋白进行同源建模, 使用 AutoDock 进行酶与低聚乳果糖的分子对接, 统计其结合能。有 5 条蛋白的结合能低于 BAB72022.1 (-8.09 kcal/mol), 分别为 WP_243076528.1 (-8.73 kcal/mol)、WP_172988759.1 (-8.86 kcal/mol)、KUM30232.1 (-9.10 kcal/mol)、BAD18121.1 (-8.65 kcal/mol)、ACB95643.1 (-8.34 kcal/mol)。来源于 *Arthrobacter* sp. EpRS66 的 β -呋喃果糖苷酶(登录号为 KUM30232.1)与低聚乳果糖的结合能最低, 并且与 *Arthrobacter* sp. K-1 β -呋喃果糖苷酶序列一致性较高, 为 79.84%。因此, 选取该蛋白序列进行编码基因合成及重组表达。

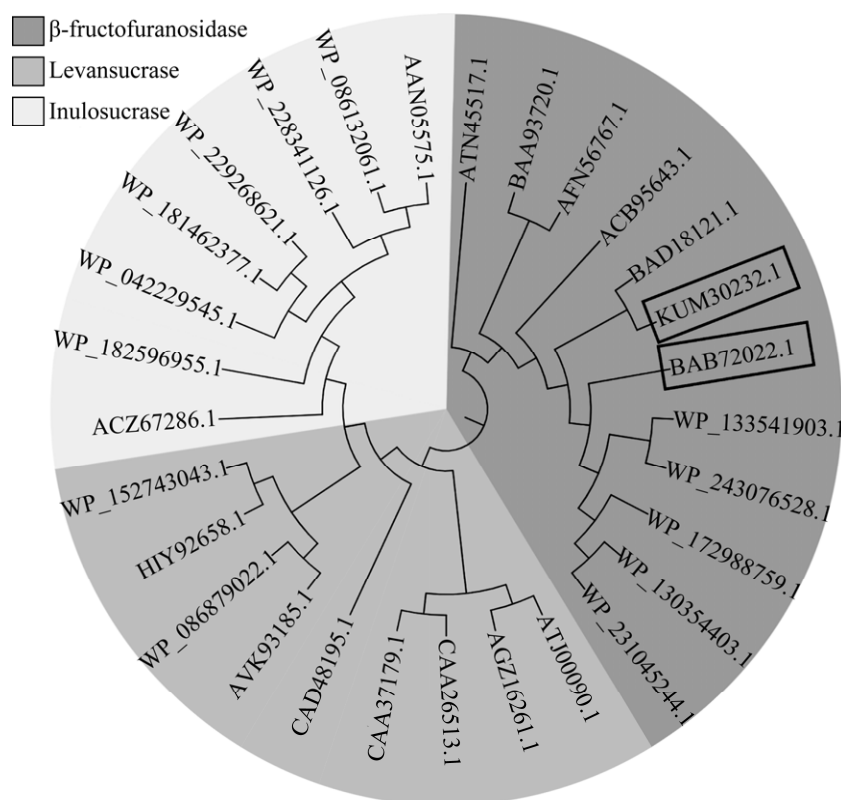


图 1 GH68 家族酶的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of representative proteins in GH68 family. The accession BAB72022.1 is the query sequence, and the accession KUM30232.1 is the gene sequence used in the this experiment.

2.2 ArFF 在 *Escherichia coli* 中的表达与纯化

将获得的重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET24a(+)-ArFF 摇瓶发酵 24 h, 测得发酵上清的低聚乳果糖酶活为 22.4 U/mL, 目标蛋白表达量约为 0.1 mg/mL。对重组酶进行纯化, 比活力为 241.1 U/mg。将重组菌发酵上清、胞内上清、包涵体纯化后的 β -呋喃果糖苷酶进行 SDS-PAGE 分析。 β -呋喃果糖苷酶的理论分子质量为 58.1 kDa, 如图 2 所示, 泳道 1 在理论分子质量附近有清晰的蛋白条带, 其表达大部分位于发酵液中, 纯化条带较为单一, 表明 β -呋喃果糖苷酶成功在 *E. coli* BL21(DE3) 中重组表达, 并且重组 β -呋喃果糖苷酶达到电泳纯级别。

2.3 ArFF 的酶学性质测定结果

2.3.1 ArFF 的最适温度与最适 pH

测定 ArFF 的最适温度, 结果如图 3A 所示, 在温度低于 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶活随着温度的升高而升高, 当温度到达 40 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性最高, 说明温度对底物和酶的影响达到平衡, 当温度超过 40 $^{\circ}\text{C}$ 后, 酶活急剧下降。因此 ArFF 的最适温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。测定 ArFF 的最适 pH, 结果如图 3B 所示, 当 pH 6.0 时酶活性最高, 说明酶活性中心相关基团的解离

最适于酶对底物的结合催化, 但当 pH 值高于或低于 6.0 时, 酶活性中心相关基团的解离不适于酶与底物的结合, 酶活降低。

2.3.2 ArFF 的稳定性

对 ArFF 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的稳定性进行探究, 结果如图 4A 所示, 在 20 min 时, 重组酶的酶活保留率为 52.0%。测定 ArFF 在不同 pH 下的稳定性, 结果如图 4B 所示, β -呋喃果糖苷酶在 pH 5.0–8.0

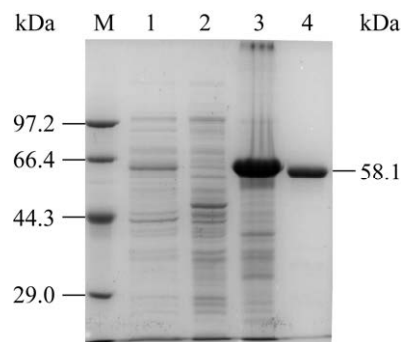


图 2 重组菌 β -呋喃果糖苷酶的 SDS-PAGE 分析
M: 蛋白标准品; 1: 发酵上清; 2: 胞内上清; 3: 包涵体; 4: 镍柱纯化样品

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant bacterial β -fructofuranosidase. M: Molecular standard marker; 1: Fermentation supernatant; 2: Intracellular soluble supernatant; 3: Inclusion body; 4: Purified enzyme by Ni^{2+} affinity chromatography.

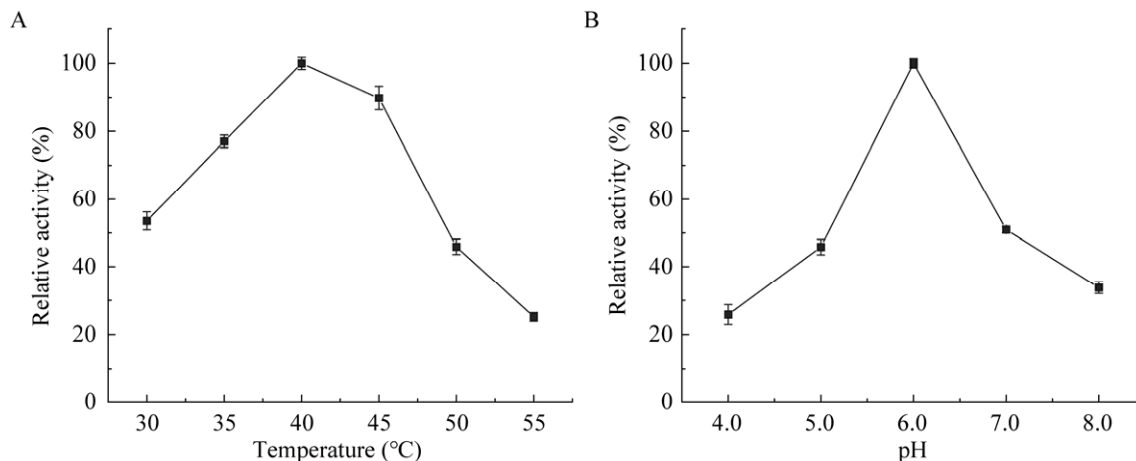


图 3 重组菌 β -呋喃果糖苷酶的最适温度(A)和最适 pH (B)

Figure 3 Optimal temperature (A) and optimal pH (B) of the recombinant bacterial β -fructofuranosidase.

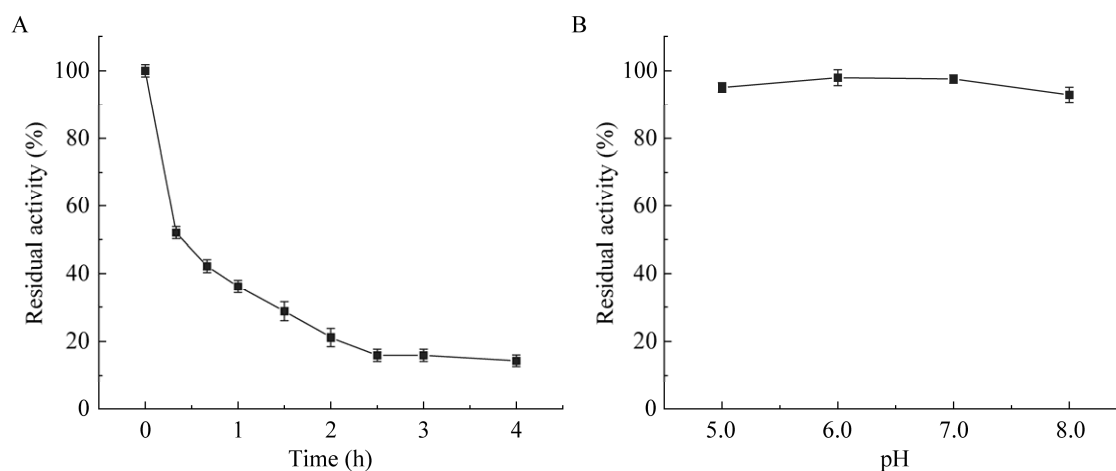


图 4 重组菌 β -呋喃果糖苷酶的温度稳定性(A)和 pH 稳定性(B)

Figure 4 Temperature stability (A) and pH stability (B) of the recombinant bacterial β -fructofuranosidase.

的环境中比较稳定,保存 24 h 还能残留 90%以上的酶活,说明该酶在较宽 pH 范围内稳定性良好。

2.3.3 ArFF 的酶促反应动力学

对重组 β -呋喃果糖苷酶进行动力学研究,结果如表 1 所示。 K_m^{sucrose} 为 178.3 g/L, K_m^{lactose} 为 16.1 g/L, K_m 可以判断酶与底物的亲和力, K_m 值越小表明酶与底物的亲和力越高, $k_{\text{cat}}^{\text{sucrose}}$ 为 5 630.8 s⁻¹, $k_{\text{cat}}^{\text{lactose}}$ 为 651.2 s⁻¹, k_{cat} 代表了单个酶分子在一秒内转化底物的数量, k_{cat} 值越大说明酶催化生成底物的速率越快,重组酶催化效率 $k_{\text{cat}}^{\text{sucrose}}/K_m^{\text{sucrose}}$ 为 31.6 L/(g·s), $k_{\text{cat}}^{\text{lactose}}/K_m^{\text{lactose}}$ 为 40.4 L/(g·s)。

2.4 ArFF 制备低聚乳果糖转化条件的优化

2.4.1 温度、pH 对低聚乳果糖转化率的影响

由于实际应用时间较酶活测定时间长,其最表 1 *Arthrobacter* sp. EpRS66 β -呋喃果糖苷酶的转苷动力学参数

Table 1 Transglycosylation kinetic parameters of the recombinant *Arthrobacter* sp. EpRS66 β -fructofuranosidase

Item	Lactose	Sucrose
K_m (g/L)	16.1±0.8	178.3±6.3
k_{cat} (s ⁻¹)	651.2±12.9	5 630.8±92.1
k_{cat}/K_m (L/(g·s))	40.4	31.6

适温度和 pH 可能存在变化,温度对制备低聚乳果糖转化率的影响如图 5A 所示,当温度低于 45 °C 时,低聚乳果糖的转化率均在 30% 以上,在 40 °C 时,转化率最高,达到 30.8%,当温度高于 45 °C 时,转化率显著下降。pH 对制备低聚乳果糖转化率的影响如图 5B 所示,在 pH 5.0–8.0 时, β -果糖苷酶能有效地合成低聚乳果糖,当 pH 6.0 时,低聚乳果糖的转化率最高。

2.4.2 底物对低聚乳果糖转化率的影响

已有研究表明,不同的蔗糖和乳糖浓度以及这两种物质的比例可能影响低聚乳果糖的转化率^[7,13],我们首先对两种物质的比例进行了探究,如图 6A 所示,当底物浓度为 1:1 时,低聚乳果糖的转化率最高。之后,固定了蔗糖和乳糖的比例为 1:1,底物含量从 20% 提高至 70%,如图 6B 所示,当底物浓度低于 30% 时,低聚乳果糖的转化率随着各底物的浓度的增加而提高,可能是因为高底物浓度抑制了水解活性。但当底物浓度高于 30% 时,虽然低聚乳果糖在不断积累,但低聚乳果糖的转化率有所降低,在底物为 60% (30% 蔗糖和 30% 乳糖) 的高浓度时,转化率仍可

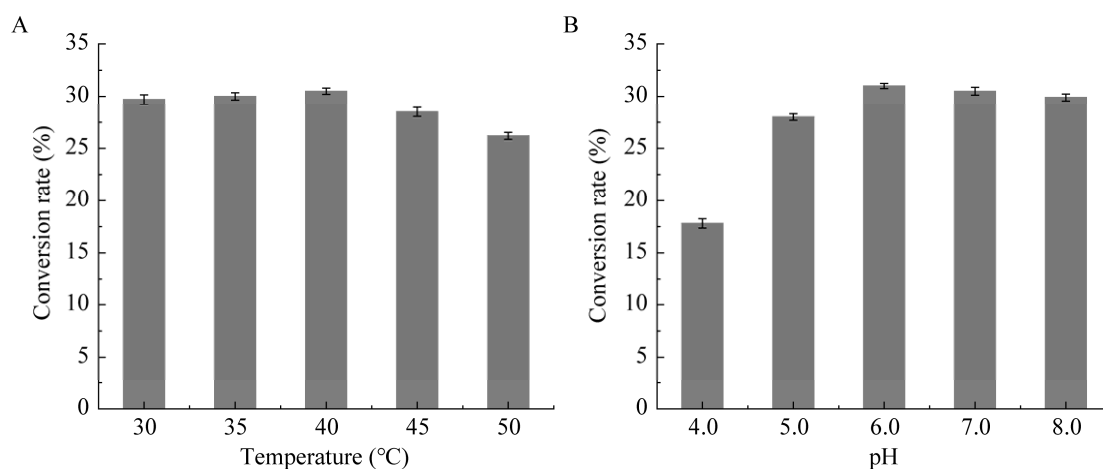


图 5 温度(A)和 pH (B)对低聚乳糖转化率的影

Figure 5 Effect of temperature (A) and pH (B) on conversion rate of lactosucrose.

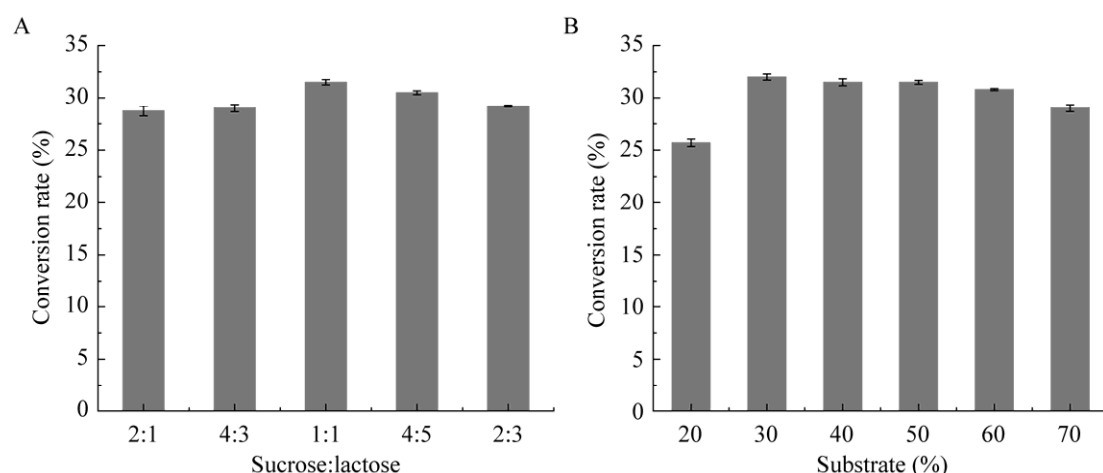


图 6 底物比例(A)和浓度(B)对低聚乳糖转化率的影

Figure 6 Effect of substrate ratio (A) and concentration (B) on conversion rate of lactosucrose.

达到较高的转化率(30.8%)。较高的底物浓度更有利于提高规模化生产效率。

2.4.3 加酶量对低聚乳糖转化率的影响

检测不同加酶量对低聚乳糖转化率的影响,结果如图 7 所示,当加酶量提高至 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,低聚乳糖的转化率最高,加酶量为 25–40 $\mu\text{g/mL}$ 时,转化率几乎无明显差距,这时提高加酶量增加反应速率,但不会改变最终平衡,当加酶量提高至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,转化率明显下降,低聚乳糖快速水解。

2.4.4 时间对低聚乳糖转化率的影响

在最优反应条件下研究反应时间对低聚乳糖转化率的影响,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0, 15%蔗糖和 15%乳糖,加酶量 25 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下,不同时间取样检测各糖含量,结果如图 8 所示,随着反应时间增加,蔗糖和乳糖不断消耗,低聚乳糖逐渐生成,反应 3 h 时,低聚乳糖产量达到 96.6 g/L,转化率达到 32.2%,随后,其水解速率大于合成速率,低聚乳糖的产量下降。

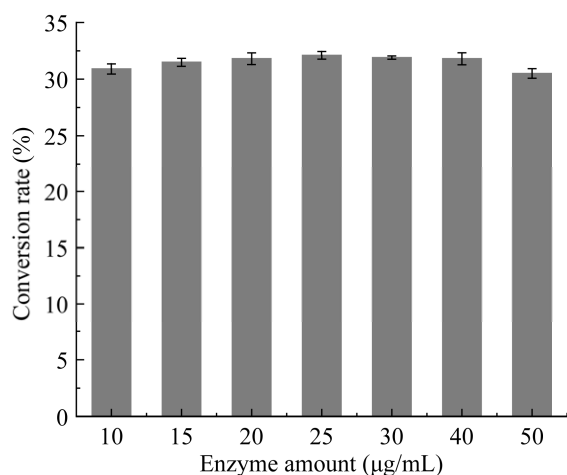


图7 加酶量对低聚乳果糖转化率的影响

Figure 7 Effect of enzyme amount on conversion rate of lactosucrose.

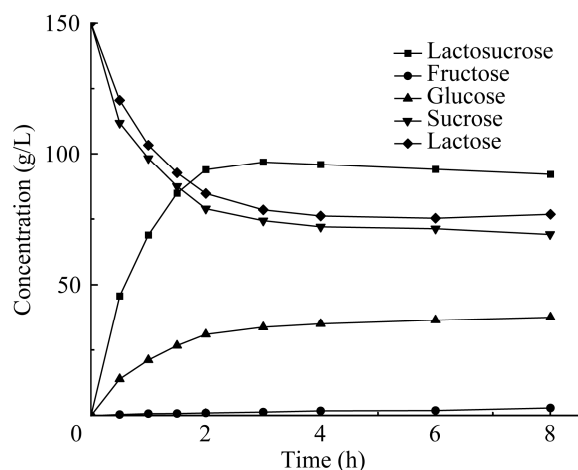


图8 各糖浓度随时间的变化情况

Figure 8 Time course of the concentration of each sugar component.

3 讨论与结论

低聚乳果糖是一种低热量的天然甜味剂,同时具有益生元特性,受到广泛关注。来源于 *Arthrobacter* sp. 的 β -呋喃果糖苷酶对乳糖的受体特异性较高,生成的低聚果糖等副产物较少,使得后续的分选纯化过程相对简单,工业上生产低聚乳果糖具有更好的应用潜力。然而,目前关于

β -呋喃果糖苷酶的研究相对较少,有必要对其进行深入的研究和发掘。本研究筛选出与低聚乳果糖分子对接结合能较低的 *Arthrobacter* sp. EpRS66 来源的 β -呋喃果糖苷酶,在 *E. coli* 中成功重组表达并测定酶学性质,对重组酶粗酶液在不同条件下制备低聚乳果糖的转化率的探究。重组酶制备低聚乳果糖的最适反应温度为 40 °C,与 *Arthrobacter* sp. 10138 来源的 β -呋喃果糖苷酶^[13] 最适反应温度一致,而其他来源的 β -呋喃果糖苷酶^[11-12] 最适反应温度均低于 40 °C。除 pH 4.0 外, pH 5.0–8.0 均能有效地合成低聚乳果糖,大多数报道的制备低聚乳果糖的最佳 pH 为 6.0–7.0^[7,13-14]。此外,该重组酶在 40 °C 下需反应 3 h 才能获得最高产物产量,反应时间远长于其在该温度下的半衰期,这可能是由于存在底物保护机制,使其稳定性提高。

同时,我们测定了重组 β -呋喃果糖苷酶的动力学参数,发现 ArFF 的 K_m^{lactose} 远小于 K_m^{sucrose} ,说明其偏好以乳糖为受体底物催化转苷反应,因而其合成低聚乳果糖产物更为单一,具有明显优势。以往的研究表明,大多数低聚乳果糖生产酶的蔗糖和乳糖最佳底物比为 1:1。例如,肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)^[14]、古德温布伦氏菌(*Brenneria goodwinii*)^[7]和甲基营养芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)^[15]来源的果聚糖蔗糖酶等,本研究也得到了类似的结果。当底物为 15% 的蔗糖和 15% 的乳糖时,获得的低聚乳果糖转化率最高,随着底物浓度的增加,低聚乳果糖产量可继续积累,但转化率逐渐降低。已报道的 β -呋喃果糖苷酶制备低聚乳果糖的底物浓度均低于 40%^[11-13],并且随着底物浓度的不断增加,转化率明显下降。然而,果聚糖蔗糖酶用于制备低聚乳果糖时的底物浓度处于较高水平。例如, *L. mesenteroides* B-512 FMC 来源的果聚糖蔗糖酶^[14]催化低聚乳果糖合成时的

底物浓度达到 54%；枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) KCCM 32835 来源的果聚糖蔗糖酶^[16]催化低聚乳果糖合成时的底物浓度达到 45%。本研究挖掘的 *Arthrobacter* sp. EpRS66 的 β -呋喃果糖苷酶虽最适底物浓度在 30%，但当底物浓度增加到 60%时，在同样的加酶量下延长反应时间，虽最终转化率有所下降但仍达到 30%，具有较好的工业应用潜力。另外，我们发现酶的添加量对低聚乳果糖的最终转化效率的影响并不显著，仅会影响达到产物最高浓度的时间。在酶添加量较高的情况下，低聚乳果糖的合成速度会提高，但低聚乳果糖的水解速度也相应加快，达到产物最高浓度时间较短；而在酶添加量较低的情况下，达到产物最高浓度的时间延长，产物的水解速率后期会显著降低。

总之，在 40 °C、pH 6.0、15%蔗糖和 15%乳糖及加酶量 25 $\mu\text{g/mL}$ 的条件下，反应 3 h 后重组酶催化低聚乳果糖转化率达到 32.2%，虽然该转化率低于文献报道的 β -呋喃果糖苷酶的转化率(36%)^[13]，但本研究使用的是发酵液粗酶液制备低聚乳果糖，能降低酶纯化成本，简化工艺流程。同时，加酶量较低，在底物浓度增加到 60%时，不提高加酶量低聚乳果糖转化率仍能达到 30.8%，在提高生产效率方面具有优势。

导致制备低聚乳果糖转化率较低的主要原因是反应过程中存在副反应和逆反应，而固定化技术或移除产物可用来提高底物的转化率^[17]，目前，酶固定化技术^[18]和添加葡萄糖氧化酶^[19]等方法已被用于连续生产较高浓度的低聚乳果糖。可见，固定化技术或协同酶辅助确实可提高酶反应转化率，但同时也增加了生产成本。因此，发展新的单独催化时转化率高的 β -呋喃果糖苷酶，对于推动低聚乳果糖规模化生产更具有价值。本研究为工业化生产低聚乳果糖提

供新的选择，同时为其进一步改造与应用奠定了基础。

REFERENCES

- [1] OHKUSA T, OZAKI Y, SATO C, MIKUNI K, IKEDA H. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora[J]. *Digestion*, 1995, 56(5): 415-420.
- [2] MIZOTE A, TANIGUCHI Y, TAKEI Y, KOYA-MIYATA S, KOHNO K, IWAKI K, KUROSE M, OKU K, CHAEN H, FUKUDA S. Lactosucrose inhibits body fat accumulation in rats by decreasing intestinal lipid absorption[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(3): 582-587.
- [3] 马依森, 刘少莉, 郑义, 陈超, 曹永强, 杨贞耐. 低聚乳果糖对益生性植物乳杆菌冰淇淋加工特性的影响[J]. *中国乳品工业*, 2021, 49(1): 25-30.
MA YM, LIU SL, ZHENG Y, CHEN C, CAO YQ, YANG ZN. Effect of lactosucrose on the processing characteristics of probiotic *Lactobacillus plantarum* ice cream[J]. *China Dairy Industry*, 2021, 49(1): 25-30 (in Chinese).
- [4] SILVÉRIO SC, MACEDO EA, TEIXEIRA JA, RODRIGUES LR. Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: a review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 74-90.
- [5] DUARTE LS, da NATIVIDADE SCHÖFFER J, LORENZONI ASG, RODRIGUES RC, RODRIGUES E, HERTZ PF. A new bioprocess for the production of prebiotic lactosucrose by an immobilized β -galactosidase[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 55: 96-103.
- [6] LIU J, MA YM, ZHANG M, LAI TT, WANG YH, YANG ZN. Biosynthesis of lactosucrose by a new source of β -fructofuranosidase from *Bacillus methanolicus* LB-1[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2023, 135(2): 118-126.
- [7] XU W, LIU Q, YU SH, ZHANG T, MU WM. Synthesis of lactosucrose using a recombinant levansucrase from *Brenneria goodwinii*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(2): 292-305.
- [8] BAHLOWAN R, KARBOUNE S, LIU L, SAHYOUN AM. Investigation of biocatalytic production of lactosucrose and fructooligosaccharides using levansucrases and dairy by-products as starting materials[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2023, 169: 110279.

- [9] MU WM, CHEN QM, WANG X, ZHANG T, JIANG B. Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(16): 7073-7080.
- [10] ITO T, FUJITA K, HARA K, TONOZUKA T, SAKANO Y. Cloning and expression of β -fructofuranosidase gene from *Arthrobacter* sp. K-1[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2002, 49(3): 291-296.
- [11] 朱桂兰, 童群义. β -呋喃果糖苷酶合成低聚乳糖的工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(12): 188-190.
- ZHU GL, TONG QY. Study on the synthesis of lactosucrose by β -fructofuranoside from *Arthrobacter* sp.[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2008, 29(12): 188-190 (in Chinese).
- [12] 廖春龙, 印遇龙, 阮征, 文红艳. β -呋喃果糖苷酶法合成低聚乳糖工艺优化[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 102-106.
- LIAO CL, YIN YL, RUAN Z, WEN HY. Process optimization for β -fructofuranoside-catalyzed synthesis of lactosucrose[J]. *Food Science*, 2011, 32(4): 102-106 (in Chinese).
- [13] CHEN CM, DENG JY, LV XQ, LI JH, DU GC, LI HZ, LIU L. Biocatalytic synthesis of lactosucrose using a recombinant thermostable β -fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp. 10138[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 416-427.
- [14] LI WJ, YU SH, ZHANG T, JIANG B, STRESSLER T, FISCHER L, MU WM. Efficient biosynthesis of lactosucrose from sucrose and lactose by the purified recombinant levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512 FMC[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(44): 9755-9763.
- [15] WU C, ZHANG T, MU WM, MIAO M, JIANG B. Biosynthesis of lactosylfructoside by an intracellular levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002[J]. *Carbohydrate Research*, 2015, 401: 122-126.
- [16] PARK NH, CHOI & HJ, OH DK. Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(7): 495-497.
- [17] TEEPAKORN C, ZAJKOSKA P, CWICKLINSKI G, DEBERARDINIS V, ZAPARUCHA A, NONGLATON G, ANXIONNAZ-MINVIELLE Z. Nitrilase immobilization and transposition from a micro-scale batch to a continuous process increase the nicotinic acid productivity[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(10): e2100010.
- [18] LEE JH, LIM JS, PARK C, KANG SW, SHIN HY, PARK SW, KIM SW. Continuous production of lactosucrose by immobilized *Sterigmatomyces elviae* mutant[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(9): 1533-1537.
- [19] LONG J, PAN T, XIE Z, XU X, JIN Z. Effective production of lactosucrose using β -fructofuranosidase and glucose oxidase co-immobilized by sol-gel encapsulation[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019, 7(10): 3302-3316.