



β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶共表达一步法催化乳糖到塔格糖

李志月¹, 张显¹, 饶志明^{1,2}, 张荣珍^{1*}

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

²江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

摘要: 【目的】构建一株以廉价原料乳糖为底物合成塔格糖的重组菌株, 实现一步法高效生物合成稀有糖——塔格糖。【方法】从*Escherichia coli* K-12基因组中, PCR扩增出阿拉伯糖异构酶 $araA$ 和 β -半乳糖苷酶 $lacZ$ 基因, 以SD-AS为连接子, 利用pET28a-1载体串联表达于*Escherichia coli* BL21(DE3), 获得重组菌*E. coli* BL21/pET28a- $araA$ - $lacZ$, 对重组菌全细胞催化合成塔格糖的条件进行了工艺优化与放大研究。【结果】 $araA$ 和 $lacZ$ 基因在*E. coli* BL21中同时高效表达, 在最优条件(pH 8.0、温度50 °C、5 mmol/L Mn^{2+} 、添加0.5 mol/L硼酸和0.1% SDS)下, *E. coli* BL21/pET28a- $araA$ - $lacZ$ 全细胞转化100 g/L乳糖, 合成塔格糖最高产量达 24.03 ± 2.03 g/L, 乳糖到塔格糖的摩尔转化率为45.67%, 随着底物乳糖浓度的提高, 塔格糖产量呈不同程度的提高, 当投加500 g/L底物乳糖时, 全细胞合成塔格糖产量最高达 83.81 ± 1.38 g/L。【结论】通过2个关键靶酶的编码基因 $araA$ 和 $lacZ$ 在*E. coli* BL21细胞中进行共表达, 实现了以重组菌全细胞为催化剂转化廉价底物乳糖, 一步法高效合成稀有糖塔格糖, 该研究为生物法制备低能量的功能性稀有糖奠定了较好的研究基础。

关键词: β -半乳糖苷酶, 阿拉伯糖异构酶, 塔格糖, 乳糖, 生物催化

塔格糖是果糖的差向异构体, 甜度近似于蔗糖, 但热量仅为蔗糖的 $1/3$ ^[1], 具有抑制高血糖、改善肠道菌群、不致龋齿等多种生理功效, 是一种低能量高功能的稀有糖, 也是保健品开发和食品升级的良好甜味替代剂, 广泛应用于食品、

医药、化妆品等领域^[2]。随着塔格糖市场的扩大, 塔格糖的高效制备成为亟待解决的问题。

塔格糖可以由半乳糖通过化学法或酶法合成^[3-4]。化学法合成塔格糖存在污染环境、副产物多且反应利用强酸强碱对反应容器和反应条件

基金项目: 国家重点研究发展计划(2018YFA0900300); 国家自然科学基金(31970045); 国家轻工业技术与工程一流学科计划(LITE2018-12); 高等学校学科创新引智计划(111-2-06); 江苏省高校学术计划; 宁夏回族自治区重点研发计划(2020BFH02011)

*通信作者。Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-12-03; 修回日期: 2021-03-24

要求极高等缺点^[3]。酶法合成塔格糖具有反应条件温和、副产物少和安全高效等特点。阿拉伯糖异构酶能够催化半乳糖异构化生成塔格糖^[1]，但该反应存在对半乳糖不利的动力学、阿拉伯糖异构酶热稳定性低和平衡常数低(酶催化的反应达到平衡时，半乳糖和塔格糖的比例约为 7:3)等问题^[5-6]。为解决这些问题，Bober 和 Nair 利用锚定蛋白将乳酸杆菌来源的 L-阿拉伯糖异构酶锚定在植物乳杆菌细胞质膜上，经化学渗透化处理分批催化 48 h，半乳糖到塔格糖的转化率为 85%^[2]；Lee 等对嗜温菌 *Bacillus halodurans*、嗜热菌 *Geobacillus stearothermophilus* 和超嗜热菌 *Thermotoga maritima* 来源的阿拉伯糖异构酶进行结构稳定性分析，发现嗜热菌的阿拉伯糖异构酶比嗜温菌的阿拉伯糖异构酶更依赖于金属离子来维持酶的稳定性^[7]；Xu 等利用藻酸盐对阿拉伯糖异构酶进行固定化，同时添加与半乳糖摩尔比为 1:10 的硼酸使反应平衡向塔格糖移动^[4]。

β -半乳糖苷酶，即乳糖酶，可以催化乳糖的

水解和转糖苷，分别生成水解产物半乳糖和葡萄糖以及转糖苷产物低聚半乳糖^[8]。不同来源的 β -半乳糖苷酶催化反应时倾向水解或转糖苷的情况不同，大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶具有较强的水解活性，而环状芽孢杆菌来源的 β -半乳糖苷酶则具有较强的转糖苷活性^[9]。 β -半乳糖苷酶可与阿拉伯糖异构酶协同催化廉价乳糖，一步法合成塔格糖，如图 1 所示。2012 年，Wanarska 等报道，重组巴斯德毕赤酵母在表达了 *Arthrobacter chlorophenolicus* 来源的 β -半乳糖苷酶后，能够分解乳糖生成半乳糖，半乳糖再经 *Arthrobacter* sp. 22c 来源的 L-阿拉伯糖异构酶催化后生成塔格糖，实现了乳糖水解率为 90%，半乳糖到塔格糖转化率为 30%^[6]。2017 年，Jayamuthunagai 等将乳清渗透物中的乳糖水解成葡萄糖和半乳糖后，利用褐藻酸盐固定化的植物乳杆菌催化其中的半乳糖生产塔格糖，获得半乳糖到塔格糖 38% 的转化率^[10]。木糖还原酶能够催化半乳糖的还原生成半乳糖醇，半乳糖醇可在半乳糖醇脱氢酶的氧

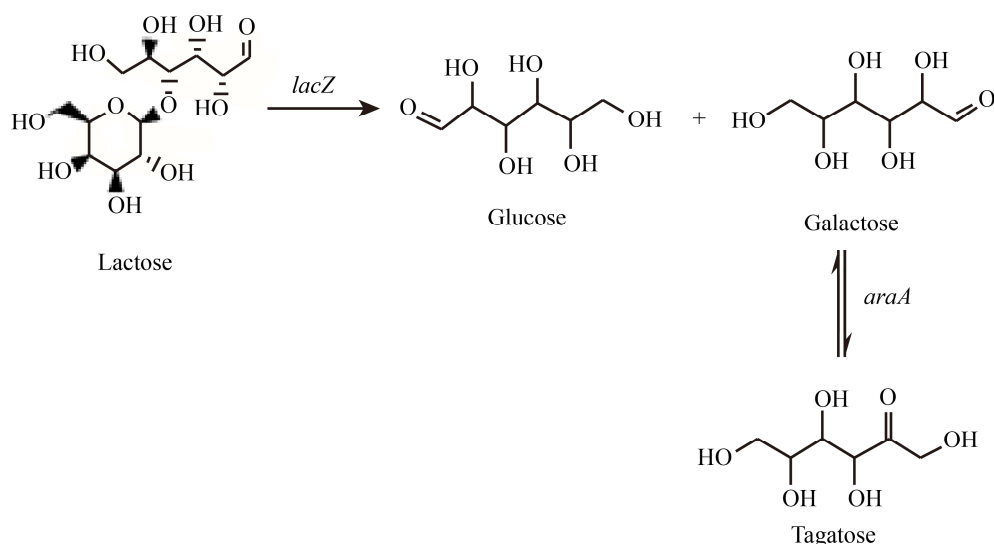


图 1. 以乳糖为底物的塔格糖生物合成途径

Figure 1. The biosynthetic pathway of tagatose with lactose as substrate.

化下生成塔格糖, 2019年, Liu等利用木糖还原酶和半乳糖醇脱氢酶的氧化还原反应克服了异构化反应的热力学极限, 以乳糖为底物生成37.69 g/L的塔格糖, 反应液中塔格糖和半乳糖的比例为9:1, 但半乳糖并不是木糖还原酶的天然底物, 且反应过程存在半乳糖醇的积累, 因此利用该途径实现产业化还需要对关键酶进行挖掘改造^[1]。2020年, Zhang等在商业化 β -半乳糖苷酶和 *Lactobacillus plantarum* 来源的重组阿拉伯糖异构酶的催化作用下, 利用两阶段的同时糖化和生物转化(SSB)从乳清粉生物合成塔格糖, 96 h后塔格糖浓度为51.5 g/L, 转化率为36.8% (以乳糖计), 但该研究在第二阶段新加入的大肠杆菌工程菌无疑增加了生产的成本^[1]。

本研究将 *E. coli* K-12 来源的 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行串联共表达, 通过对全细胞催化过程中的 pH、温度、 Mn^{2+} 、硼酸和细胞通透剂添加等因素的优化, 实现了以廉价乳糖为底物, 以全细胞为催化剂, 一步法合成塔格糖。本研究为全细胞催化低值化学品、高效制备高附加值的功能性糖提供了借鉴。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒、培养基及试剂

E. coli K-12(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、表达载体 pET28a-1 由实验室保藏, 引物委托苏州金唯智生物科技有限公司合成。其中扩增 *araA* 基因的引物为 F1 (5'-ATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGACGATTTTTGATAATTATG-3') 和 F2 (5'-CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTAGCGACGAAATCCGTAATA-3'); 扩增 *lacZ* 基因的引物为 F3 (5'-GGGTCGCGGATCCGAATTCTGACCATGATT

ACGGATTC ACTGG-3') 和 F4 (5'-GGTGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATTTTTGACACCA-3')。

LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, 酵母粉 5 g/L。固体培养基添加 2% 的琼脂。DNA 分子量标准、蛋白分子量标准和感受态制备试剂盒等购自 TaKaRa 公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、小量质粒提取试剂盒、细菌 DNA 基因组提取试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司; 高保真 DNA 聚合酶 2 \times Phanta[®] Max Master Mix、ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit 重组克隆试剂盒等购自南京诺唯赞生物科技有限公司。塔格糖标准品购自 Sigma 公司。其他分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株构建

根据设计的引物, 以 *E. coli* K-12 基因组为模板, 分别扩增出 β -半乳糖苷酶编码基因 *lacZ* 和阿拉伯糖异构编码基因 *araA*。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶对表达载体 pET28a-1 进行酶切处理。将 *lacZ* 和 *araA* 基因片段利用 ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning Kit 重组克隆试剂盒分别连接到表达载体 pET28a-1 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 两酶切位点之间, 利用感受态细胞转化法转化到 *E. coli* BL21(DE3), 分别构建表达 *lacZ* 和 *araA* 的重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*araA*。利用引物扩增出中间添加 SD-AS 序列(GAAGGAGATATACC)作为连接子的两基因 *lacZ* 和 *araA* 后, 连接到表达载体 pET28a-1 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 两酶切位点之间, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 构建出双基因串联位置不同的共表达重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA*。

1.3 *lacZ* 和 *araA* 基因的表达、酶蛋白的纯化

将重组菌活化后接种于 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h 后以 1%接种量转接于 50 mL LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养至 OD_{600} 值约 0.6 左右时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 25 °C 培养 10 h, 8000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用生理盐水洗涤细胞 2 次, 将菌体悬浮于 pH 8.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液中。

将收集到的菌体经洗涤悬浮处理, 用 Scientz-II D 型超声破碎仪(20 MHz, 65%振幅, 工作 1 s, 停 3 s)破碎 15 min 后, 10000 r/min 离心 20 min, 收集上清液(即为粗酶液)和沉淀, SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。采用镍柱亲和层析法对粗酶液进行纯化, 借助 AKTA Prime 蛋白纯化仪将粗酶液流经预平衡的 HisTrap FF crude 预装柱(0.7 cm×2.5 cm), 用含有 0–200 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液进行线性梯度洗脱, 洗脱缓冲液流速为 0.1 mL/min, 利用 280 nm 波长的紫外线检测信号监测洗脱出溶液中的蛋白含量, 收集目标蛋白, 将目标蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析。获得的纯酶用于酶活测定。

1.4 酶活测定

酶活测定反应体系(1 mL): 利用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0)配置酶液和底物溶液, 在反应体系中添加 500 μ L 浓度为 200 g/L 的底物溶液、200 μ L 酶液和 300 μ L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 7.0), 37 °C 下反应 20 min, 沸水浴终止反应。蛋白质浓度利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。 β -半乳糖苷酶酶活定义为: 标准条件下(pH 7.0, 37 °C)以乳糖为底物, 每分钟催化生成 1 μ mol 产物葡萄糖所需酶量为一个酶活单位; 阿拉伯糖

异构酶酶活定义为: 标准条件下(pH 7.0、37 °C)以半乳糖为底物, 每分钟催化生成 1 μ mol 产物塔格糖所需酶量为一个酶活单位。

利用 HPLC 方法检测样品中糖的种类及含量, 具体条件为: Carbomix-Ca-NP 色谱柱, 超纯水为流动相, 流速 0.4 mL/min, 柱温 80 °C, 示差检测器, 检测温度 50 °C, 进样量 20 μ L。

1.5 重组菌粗酶液催化活力的验证

反应体系(1 mL): 利用 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.0)配置粗酶液和底物溶液, 在反应体系中添加 500 μ L 浓度为 200 g/L 的底物溶液、200 μ L 粗酶液和 300 μ L Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 8.0), 50 °C 条件下反应 20 min, 沸水浴终止反应。利用 HPLC 检测塔格糖生成量, 计算相对酶活力。在此反应体系的基础上进行粗酶液最适催化 pH、温度、金属离子的反应和粗酶液催化乳糖生成塔格糖的反应。

1.6 共表达重组菌全细胞转化乳糖合成塔格糖条件优化

全细胞催化反应体系总体积为 10 mL: 用 0.2 mol/L pH 8.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸作为缓冲液使反应体系中乳糖终浓度为 100 g/L, 控制细胞浓度 OD_{600} 为 40, 50 °C 条件下反应 48 h, 沸水浴终止反应。利用 HPLC 对反应液中成分及含量进行检测。在此反应体系的基础上进行全细胞催化反应条件的优化反应。

2 结果和分析

2.1 菌株构建及 *lacZ* 和 *araA* 基因的表达、纯化及酶活测定

以 *E. coli* K-12 基因组为模板, 成功扩增出

1500 bp 左右的 *araA* 基因和 3000 bp 左右的 *lacZ* 基因, 将 *lacZ* 和 *araA* 基因片段分别连接到表达载体 pET28a-1 上。设计两基因 *araA* 和 *lacZ* 中间添加 SD-AS 序列的引物以扩增 *araA* 和 *lacZ* 基因, 将两基因连接到表达载体 pET28a-1 上, 导入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 获得单独表达 *lacZ* 和 *araA* 的重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*araA*、双基因共表达重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA*。重组菌进行诱导、培养和细胞破碎离心后, 对破碎后的上清液(粗酶液)和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 2-A-D 所示, 在 116 kDa 和 55 kDa 处出现明显条带, 分别与 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的理论分子量吻

合(β -半乳糖苷酶蛋白简称为 LacZ, 阿拉伯糖异构酶蛋白简称为 L-AI), *araA* 和 *lacZ* 两个基因在重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*、*E. coli* BL21/pET28a-*araA*、*E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* 中均实现了表达, 且主要为可溶性表达, 分布于细胞破碎上清液中, 细胞破碎沉淀中仅含有微量包涵体。

利用镍柱亲和层析法对重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*araA* 的粗酶液进行了分离纯化, SDS-PAGE 结果(图 2-E)显示, 已获得电泳纯 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的纯酶。利用纯酶液进行酶活测定, β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的比酶活分别为 135.5 U/mg 和 34.54 U/mg。*E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ*

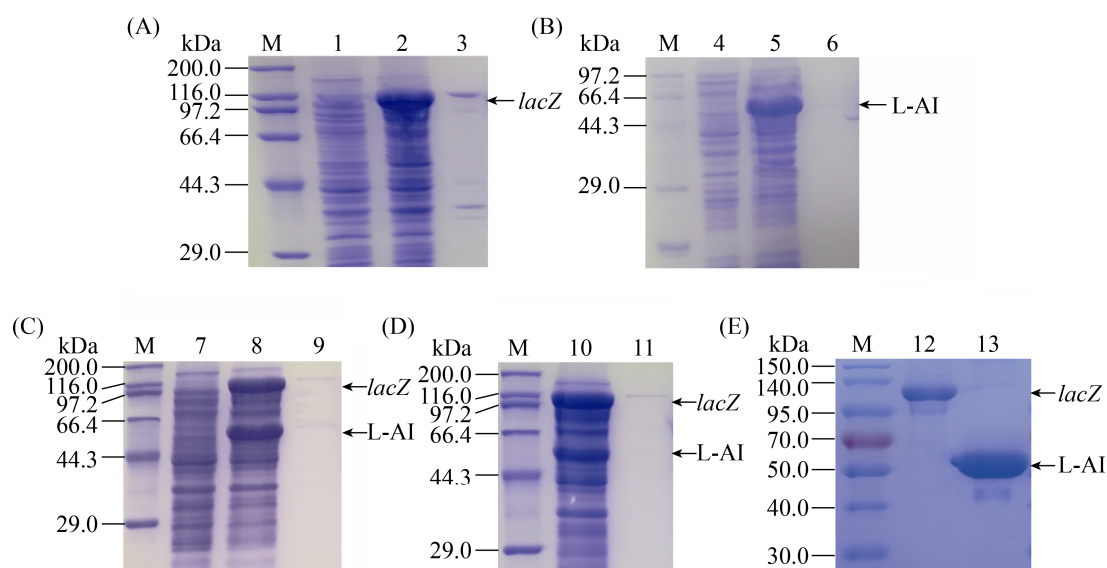


图 2. LacZ 和 L-AI 蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Figure 2. The SDS-PAGE analysis of LacZ and L-AI expression in *E. coli* and purification. A: expression of LacZ and L-AI in *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*; B: *E. coli* BL21/pET28a-*araA*; C: *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ*; D: *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA*; E: purified enzyme LacZ and L-AI. M: protein marker; 1, 4, 7: the crude enzyme of *E. coli* BL21/pET28a; 2, 5, 8, 10: the crude enzyme of *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*, *E. coli* BL21/pET28a-*araA*, *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ*, *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* separately; 3, 6, 9, 11: the precipitate of *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*, *E. coli* BL21/pET28a-*araA*, *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ*, *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* separately; 12-13: the purified enzyme of LacZ and L-AI.

粗酶液中 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的酶活分别为 93.62 U/mL 和 23.41 U/mL, *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* 粗酶液中 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的酶活分别为 107.36 U/mL 和 16.27 U/mL, 可以看出重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* 粗酶液中阿拉伯糖异构酶酶活相对于重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 粗酶液中的阿拉伯糖异构酶有所降低。

2.2 重组菌粗酶液催化活力的验证

对 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* 粗酶液催化乳糖生成塔格糖的能力进行测试, 同时在相同的培养条件下对两株重组菌进行培养, 收集菌体经处理使菌悬液细胞浓度一致 ($OD_{600}=40$) 后破碎离心获得粗酶液, 因此, 某种程度上, 基本能够保证反应体系中两重组菌粗酶液的酶蛋白量相对一致。反应体系放大到 10 mL, 以 0.2 mol/L pH 8.0 的 Na_2HPO_4 -柠檬酸为缓冲液使乳糖终浓度为 100 g/L, 添加 2 mL 粗酶液, 50 °C 条件下进行反应, 在反应的第 0、6、18、24 h 取 500 μ L 反应液经处理后利用 HPLC 分析反应液中的成分及含量。如图 3 所示。重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 粗酶液催化乳糖生成塔格糖的能力要优于 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA*。因此后续将重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 的粗酶液作为一个整体对其催化特性进行初步探索。

对重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 粗酶液催化反应的 pH、温度、金属离子、热稳定性等催化活力进行了测定, 以塔格糖的产量作为判断粗酶液活性的指标, 测定了各条件下的相对酶活。

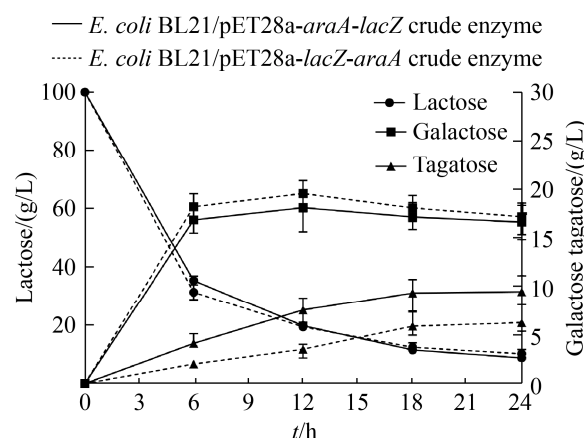


图 3. *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* 粗酶液催化乳糖生成塔格糖进程曲线

Figure 3. The crude enzyme of *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* and *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ-araA* catalyzing lactose to tagatose.

对粗酶液生成塔格糖最适反应 pH 测定时, 利用 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸 (pH 2.2–8.0)、Tris-HCl (pH 8.0–9.0) 或 NaOH-甘氨酸 (pH 9.0–10.0) 作为缓冲液分别在 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 条件下 50 °C 反应 20 min。以 0.2 mol/L Na_2HPO_4 -柠檬酸 (pH 8.0) 为缓冲液, 在 30、40、50、60、70 °C 的温度下测定粗酶最适反应温度。结果如图 4-A 和 4-B 所示, 重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 粗酶液催化乳糖生成塔格糖的最适 pH 为 9.0 (Tris-HCl), 粗酶液催化乳糖生成塔格糖的最适温度为 50 °C。据文献报道, pH 过高会加剧糖的梅拉德反应^[12], 不利于塔格糖的积累, 且在 pH 8.0 和 pH 9.0 时, 粗酶催化的相对转化率均保持在 90% 以上, 因此测定了 Na_2HPO_4 -柠檬酸 (pH 8.0) 和 Tris-HCl (pH 9.0) 两种缓冲液对粗酶液催化乳糖生成塔格糖的影响。放大反应体系到 10 mL, 利用不同的缓冲液使反应体系中乳糖终浓度为 100 g/L, 加入粗酶

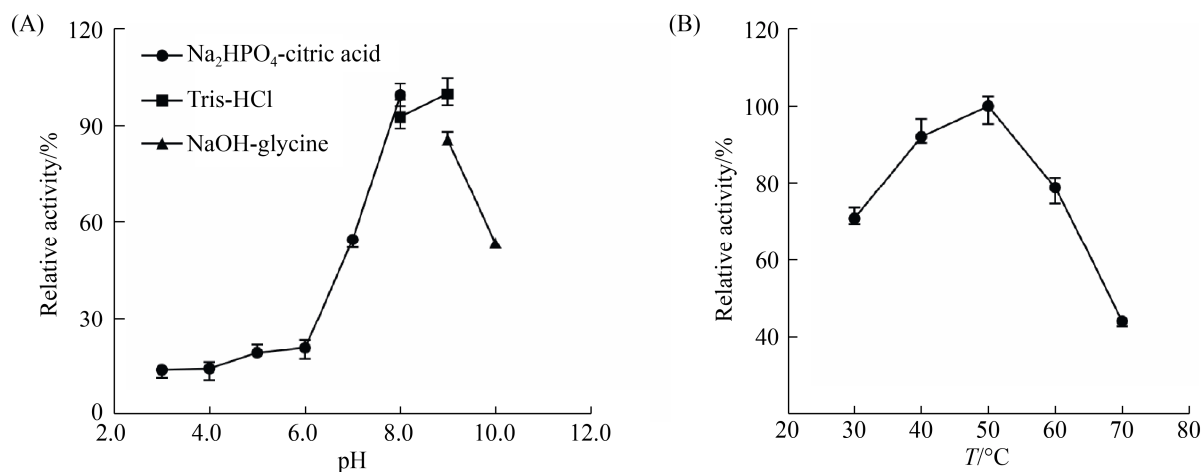


图 4. pH 和温度对重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 粗酶的影响

Figure 4. Effect of pH and temperature on crude enzyme catalyzing the synthesis of tagatose. A: effect of pH; B: effect of temperature.

液 2 mL, 在 50 °C 条件下进行反应, 在反应的 0、6、12、18、24 h 取 500 μ L 反应液进行 HPLC 分析。如图 5 所示, 在较长时间的转化反应中, Na₂HPO₄-柠檬酸(pH 8.0)更利于塔格糖的生成。因此后续采用 Na₂HPO₄-柠檬酸(pH 8.0)作为缓冲液进行生物催化反应。大肠杆菌 *E. coli* K-12 来源的 β -半乳糖苷酶的最适催化 pH 为 7.2^[13], 大肠杆菌 *E. coli* K-12 来源的阿拉伯糖异构酶最适 pH 为 8.0^[14], 当双酶的粗酶形式催化乳糖合成塔格糖时最适 pH 为 8.0, 这可能是因为双酶在催化乳糖生成塔格糖的过程中, 虽然不在 β -半乳糖苷酶的最适催化 pH, 但其催化活性依然很高。所以乳糖很快被利用, 半乳糖积累(如图 5 所示), 当双酶催化乳糖生成塔格糖的 pH 倾向于阿拉伯糖异构酶的最适 pH 时会增加塔格糖的生成量。大肠杆菌 *E. coli* K-12 来源的 β -半乳糖苷酶的最适催化温度为 40 °C^[13], 大肠杆菌 *E. coli* K-12 来源的阿拉伯糖异构酶的最适催化温度为 40–50 °C^[15], 温度升高, 阿拉伯糖异构酶催化的可逆异构化反应倾向于塔格糖合成的方向, 因此在保证酶催化

过程中酶活稳定性的条件下, 温度升高转化率相应提高。

粗酶的热稳定性测定在 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 8.0)中进行, 分别在 4、30、50 °C 水浴 5、12、24、48、72、96、120 h 后取 200 μ L 酶液加入上述 1 mL 酶活测定反应体系, 测定生成产物量, 计算相对粗酶活力。结果如图 6 所示, 50 °C

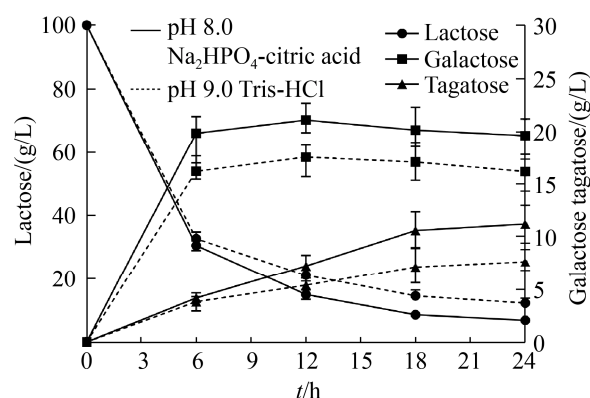


图 5. 不同缓冲液对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 粗酶液催化乳糖生成塔格糖的影响

Figure 5. Effect of different buffer on crude enzyme of *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ catalyzing lactose to tagatose.

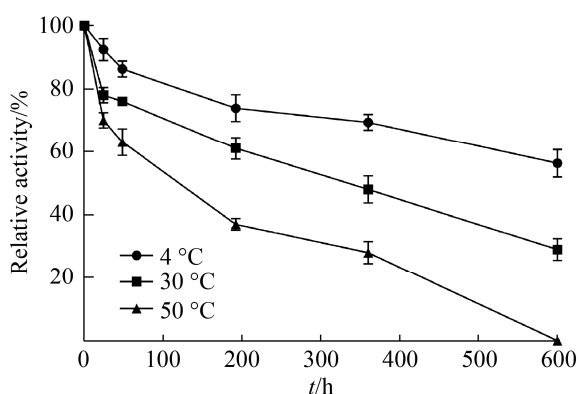


图 6. 重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 的粗酶温度稳定性

Figure 6. The thermal stability of *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ crude enzyme.

处理 120 h 时催化乳糖生成塔格糖的能力仍为初始时的一半，能够保证塔格糖的稳定合成。

据报道金属离子会对阿拉伯糖异构酶的催化有影响^[1,3,16]，为了验证不同金属离子对双酶催化反应的影响，在各反应组中加入终浓度为 5 mmol/L 的不同金属离子溶液：MnCl₂、CoCl₂、FeCl₂、CuCl₂、ZnCl₂、MgCl₂ 或 NiCl₂ 溶液，结果如图 7 所示。反应过程中 Cu²⁺、Zn²⁺、Ni²⁺的

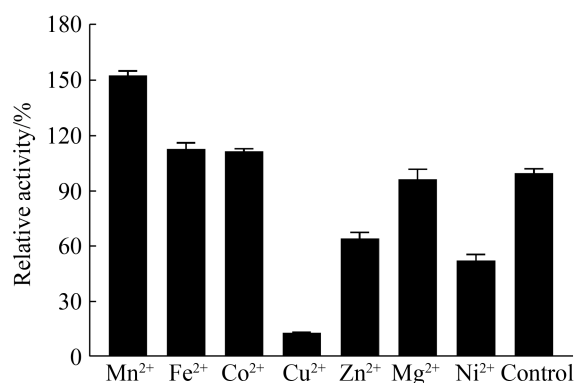


图 7. 不同金属离子对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 粗酶的影响

Figure 7. Effect of different metal ions on crude enzyme of *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ catalyzing lactose to tagatose.

存在不利于塔格糖的生成，Mn²⁺、Co²⁺、Fe²⁺会不同程度促进塔格糖的生成，尤其是 Mn²⁺，使乳糖到塔格糖的转化率相对于不添加金属离子时提高了 1.5 倍。

2.3 共表达重组菌全细胞转化条件优化

与粗酶催化过程相比，全细胞催化具有抗环境扰动性和更低的有效酶成本的特点^[17]，因此本研究优化了重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞转化 pH、温度、金属离子 Mn²⁺、硼酸、细胞通透剂添加等条件。

2.3.1 共表达重组菌全细胞转化反应的最适 pH 和温度的测定

利用 0.2 mol/L Na₂HPO₄-柠檬酸 (pH 2.2–8.0)、Tris-HCl (pH 8.0–9.0) 和 NaOH-甘氨酸 (pH 9.0–10.0) 作为缓冲液分别在 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 条件下测定全细胞催化最适反应 pH 值。分别在 30、40、50、60、70 °C 条件下测定全细胞催化最适反应温度。如图 8-A 所示，pH 对全细胞催化塔格糖合成影响趋势相似，缓冲液选用 pH 8.0 的 Na₂HPO₄-柠檬酸。最适温度为 60 °C，由于 β-半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶在 50 °C 时热稳定性更好，且在 50 °C 和 60 °C 时乳糖到塔格糖的质量转化率分别为 15.65% 和 16.23%，并无较大差异 (图 8-B)。考虑到塔格糖合成时间较长，为避免温度过高导致产物塔格糖发生严重的梅拉德反应和酶活的丧失，因此，后续选用 50 °C 作为 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 的全细胞催化温度。

2.3.2 最适金属离子 Mn²⁺ 浓度、硼酸浓度及细胞通透剂种类

由于对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 粗酶液催化活力的验证过程中，金属离子 Mn²⁺ 能促进塔格糖的生成，因此对在不同浓度 (1、3、5、7、9、10 mmol/L) 的 MnCl₂ 条件下的全细

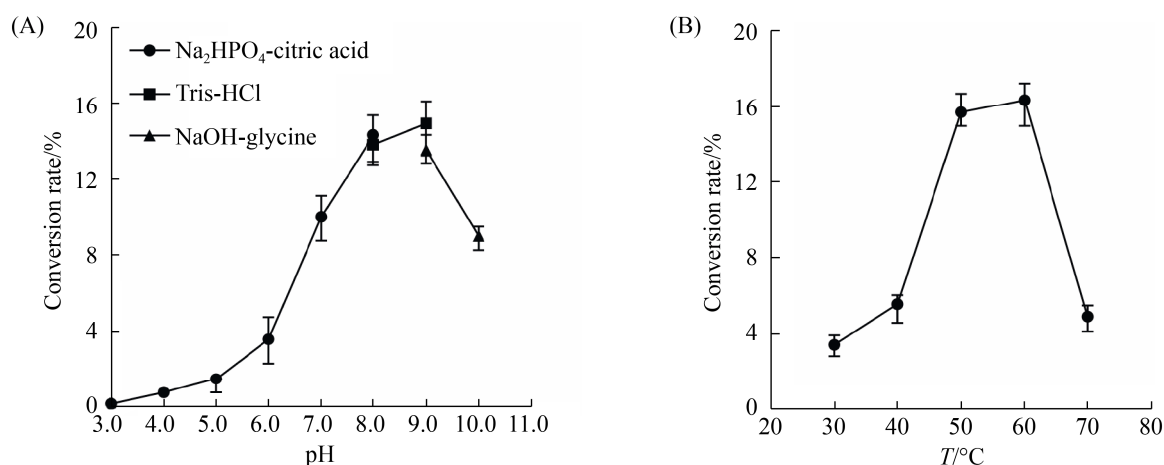


图 8. pH 和温度对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化合成塔格糖的影响

Figure 8. Effect of pH and temperature on *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ catalyzing the synthesis of tagatose. A: effect of pH; B: effect of temperature.

胞催化活性进行了检测分析, 结果(图 9-A)表明, 当 Mn^{2+} 浓度为 5 mmol/L 时, 全细胞 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 合成塔格糖的效率最高, 乳糖到塔格糖的质量转化率为 18.5%。

已有研究发现, 硼酸可与塔格糖结合形成塔格糖-硼酸复合物, 该复合物不参与半乳糖和塔格糖的异构反应, 且硼酸与塔格糖的亲合力高于与半乳糖的亲合力, 可推动异构反应向塔格糖生成方向移动, 显著提高产物塔格糖的生成量^[4,17]。测定全细胞最适催化硼酸浓度时, 添加最适浓度的 $MnCl_2$, 反应体系中的硼酸终浓度分别为 0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L。结果如图 9-B 所示, 通过添加不同浓度的硼酸, 对塔格糖的合成具有较大影响。一定范围内, 随着硼酸浓度的升高, 塔格糖生成量增加, 当硼酸浓度为 0.5 mol/L 时, 反应液中塔格糖的浓度最高, 为 20.75 g/L, 硼酸浓度超过 0.5 mol/L 时, 塔格糖生成量随硼酸浓度的升高而降低。硼酸-塔格糖复合物中的硼酸可在下游工程的纯化过程中除去。Lim 等使

用 Amberlite IRA-743 和 Dowex X50X8 树脂(4:1, V/V)进行层析可将形成的塔格糖-硼酸复合物中的硼酸去除, 去除率达到 99%以上^[18]。

全细胞催化过程中菌体细胞以静息活细胞的状态存在, 底物和产物通过细胞膜上特定的运输蛋白进出细胞, 底物和产物的流通性直接影响产物的转化效率。Kim 等通过改造甲基半乳糖苷转运系统转运蛋白 mgIB, 来降低半乳糖和塔格糖的摄取率, 使细胞膜对底物和产物产生差异选择性, 推动反应平衡向塔格糖移动^[16]。为解决这一问题, 在全细胞反应体系的基础上添加最适浓度的 $MnCl_2$ 和硼酸, 各实验组中分别添加 0.1% 的 TritonX-100、SDS、CTAB、溶菌酶、油酸处理等细胞通透剂, 结果如图 10-A 所示, 在多种细胞通透剂中, SDS 能够达到最好的透化效果, 当添加 SDS 进行重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化时, 乳糖到塔格糖的质量转化率较添加前提高了 1.2 倍左右, 此时转化率为 23.86%, 且反应达到相对平衡所需时间相对缩短(图 10-B)。

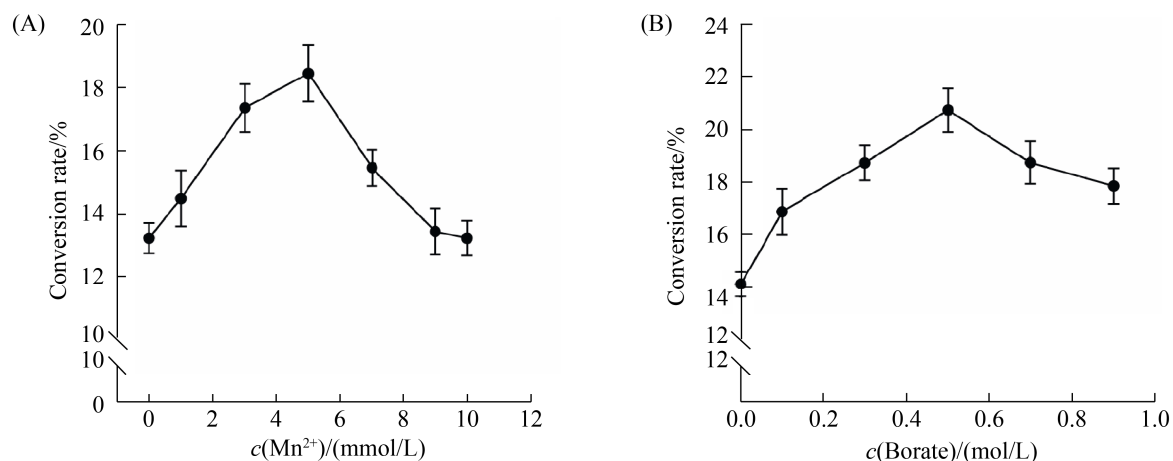


图 9. Mn^{2+} 和硼酸浓度对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化合成塔格糖的影响

Figure 9. Effect of Mn^{2+} and boric acid concentrations on *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ catalyzing the synthesis of tagatose. A: effect of Mn^{2+} concentrations; B: effect of boric acid concentrations.

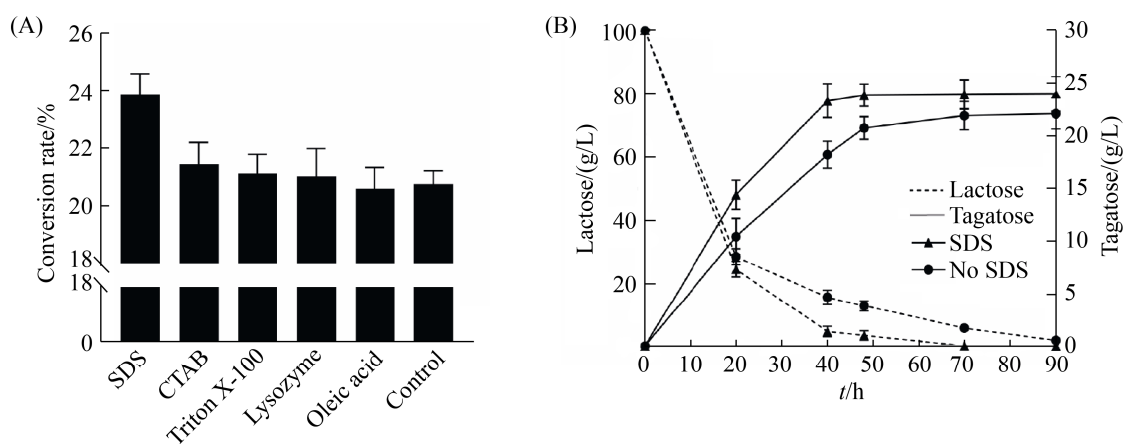


图 10. 不同透化条件对 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化合成塔格糖的影响

Figure 10. Effect of different permeabilized agents on *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ catalyzing the synthesis of tagatose. A: effect of different permeabilized agents; B: whole-cell catalysis with or without SDS.

2.3.3 反应体系中细胞浓度的优化: 放大转化体系为 100 mL, 在乳糖终浓度为 100 g/L、0.2 mol/L pH 8.0 Na_2HPO_4 -柠檬酸作为缓冲液, 添加终浓度为 5 mmol/L $MnCl_2$ 、0.5 mol/L 硼酸和 0.1% SDS, 控制细胞浓度 OD_{600} 值分别为 20、30、40、50、60、70, 50 °C 进行反应, 在反应的 0、20、40、70、90 h 取样测定底物和产物量的变化。当反应体系中菌体细胞密度 OD_{600} 为 50 时, 塔格糖生成

量达到最高, 产量为 24.03 g/L (如图 11 所示)。在一定范围内, 当全细胞菌悬液浓度越高, 塔格糖生成量相应提高, 但超过一定范围, 因菌浓过高介质流通缓慢导致底物和产物流动性下降, 相应转化率也随之下降。

2.3.4 不同底物浓度下塔格糖的生成: 将重组菌 *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 在全细胞最适转化条件下进行全细胞转化的放大实验。转化体系

为 100 mL, 投加乳糖使反应体系中的乳糖终浓度分别为 100、200、300、400、500 g/L 的, 在转化第 0、5、10、20、40、70、90 h 时取 1 mL 反应液, 经处理后利用 HPLC 检测底物残余量和产物生成量, 分析塔格糖的转化效率。结果如图 12 所示, 反应 40 h 后, 塔格糖生成趋于缓慢。重组菌 *E. coli*

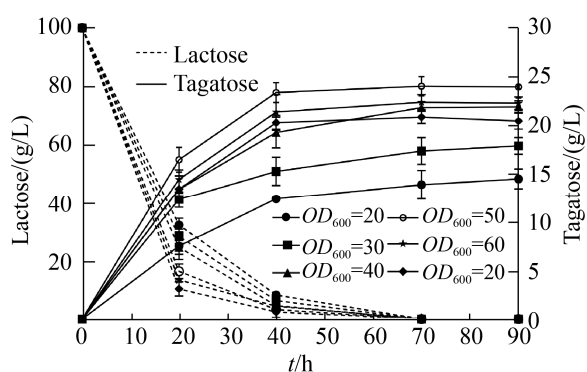


图 11. *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 菌悬液浓度对转化的影响

Figure 11. Effect of cell concentration of *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ on catalyzing the synthesis of tagatose.

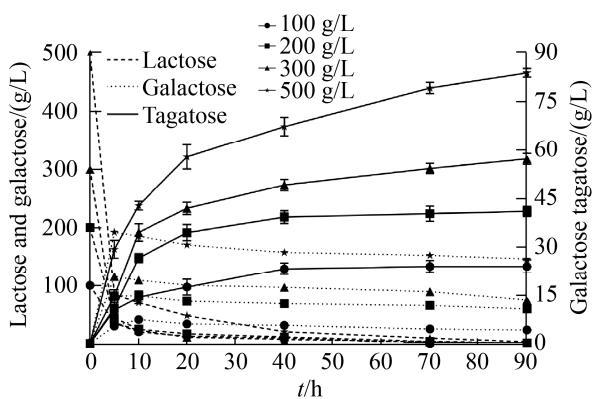


图 12. *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化不同浓度的乳糖转化塔格糖

Figure 12. The synthesis of tagatose by the whole-cell of *E. coli* BL21/pET28a-araA-lacZ at different lactose concentrations.

BL21/pET28a-araA-lacZ 全细胞催化 100 g/L 乳糖, 合成塔格糖的最大产量可达 24.03 ± 2.03 g/L, 乳糖到塔格糖的质量转化率为 24.03%。在 500 g/L 乳糖为底物的条件下, 塔格糖生成量达到 83.81 ± 1.38 g/L, 乳糖到塔格糖的质量转化率为 16.76%。随着底物乳糖浓度的增加, 反应到达平衡所需时间也增加, 转化率也有不同程度的降低。这很可能由于乳糖浓度越高, 反应体系流动阻力越大, 底物和产物流通性下降; 另一方面, 乳糖浓度过高会促进 β -半乳糖苷酶的转糖苷功能合成低聚半乳糖, 从而影响中间产物半乳糖的合成, 且葡萄糖和半乳糖会抑制 β -半乳糖苷酶的反应^[8]。

3 讨论

E. coli K-12 自身含有阿拉伯糖异构酶基因和 β -半乳糖苷酶基因, 但阿拉伯糖异构酶和 β -半乳糖苷酶本底水平表达效率低, 一般检测不到酶活性^[19], 在前人研究过程中, 对 *E. coli* K-12 来源的 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶的研究较明晰^[20], 且大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶的水解效果优于其他微生物来源的 β -半乳糖苷酶^[9]。*E. coli* BL21(DE3) 是以 T7 RNA 聚合酶为表达系统的高效外源基因的蛋白表达宿主, 表达效率较高。因此, 本研究利用连接了 SD-AS 序列偶联 *E. coli* K-12 来源的阿拉伯糖异构酶和 β -半乳糖苷酶在 *E. coli* BL21(DE3) 宿主中共表达, 从而实现了从较廉价的乳糖为底物一步转化合成产物塔格糖。

通过优化共表达重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 催化乳糖合成塔格糖的多种反应条件,使其合成产物的转化率达到最高。如通过添加金属离子 Mn^{2+} 能够显著提高催化效率^[3]。由于硼酸与塔格糖的亲合力高于半乳糖,塔格糖可与硼酸结合生成塔格糖-硼酸复合物,该物质不参与半乳糖和塔格糖的异构化可逆反应^[18],当全细胞转化过程添加硼酸时,为了达到平衡,半乳糖和塔格糖的异构化可逆反应向合成塔格糖的方向移动,塔格糖的生成量显著增加^[11]。利用全细胞的形式进行生物转化存在细胞膜作为胞内与外界屏障阻碍底物产物进出的现象,当添加 SDS 时,这种表面活性剂会破坏膜上蛋白,使细胞膜屏障作用降低,增加了底物和产物的流通,并且底物和产物在细胞膜两侧不同程度的分布,也能较好地促进反应向产物合成的方向进行^[2]。最终重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* 静息全细胞催化底物乳糖合成产物塔格糖的最优条件为: pH 8.0、50 °C,添加 5 mmol/L Mn^{2+} 、0.5 mol/L 硼酸和 0.1% 的 SDS 作细胞通透剂,重组菌悬液浓度 OD_{600} 值为 50 的条件下,投加 100 g/L 底物乳糖,可生成塔格糖最高产量达 24.03 ± 2.03 g/L,乳糖到塔格糖的质量转化率为 24.03%,摩尔转化率为 45.67%,随着底物投加量的增加,塔格糖产量有不同程度的提高,在 500 g/L 乳糖载量下,全细胞转化合成塔格糖产量最高可达 83.81 ± 1.38 g/L,该产量为国内利用乳糖一步法合成塔格糖的最高报道水平。由于大肠杆菌转化制备一些食品添加剂时,有可能会带入一些肠毒素,后续研究将利用枯草芽孢杆菌或酵

母菌等食品安全菌株作为酶表达的宿主细胞,进行两种靶酶的异源共表达,更安全更高效催化乳糖等低值底物,合成更高附加值的产物塔格糖等。为了 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶协同催化乳糖生成塔格糖的反应获得更好的催化效果,后续还可以对两个关键酶的启动子或核糖体结合位点等作进一步的优化调控。

参 考 文 献

- [1] Zhang GY, Zayed HM, Yun JH, Yuan J, Zhang YF, Wang Y, Qi XH. Two-stage biosynthesis of D-tagatose from milk whey powder by an engineered *Escherichia coli* strain expressing L-arabinose isomerase from *Lactobacillus plantarum*. *Bioresource Technology*, 2020, 305: 123010.
- [2] Bober JR, Nair NU. Galactose to tagatose isomerization at moderate temperatures with high conversion and productivity. *Nature Communications*, 2019, 10: 4548.
- [3] Du MG, Zhao DY, Cheng SS, Sun D, Chen M, Gao ZQ, Zhang CZ. Towards efficient enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: purification and characterization of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus brevis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, 42(1): 107–116.
- [4] Xu Z, Li S, Fu FG, Li GX, Feng XH, Xu H, Ouyang PK. Production of D-tagatose, a functional sweetener, utilizing alginate immobilized *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166(4): 961–973.
- [5] Roh HJ, Kim P, Park YC, Choi JH, Chouayekh HEA. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose by expression of L-arabinose isomerase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 31(1): 1–4.
- [6] Marta W, Józef K. A method for the production of D-tagatose using a recombinant *Pichia pastoris* strain secreting beta-D-galactosidase. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 113.

- [7] Lee DW, Hong YH, Choe EA, Lee SJ, Kim SB, Lee HS, Oh JW, Shin HH, Pyun YR. A thermodynamic study of mesophilic, thermophilic, and hyperthermophilic l-arabinose isomerases: The effects of divalent metal ions on protein stability at elevated temperatures. *FEBS Letters*, 2005, 579(5): 1261–1266.
- [8] Zhao L, Zhou YZ, Qin S, Qin PP, Chu JL, He BF. B-galactosidase BMG without galactose and glucose inhibition: Secretary expression in *Bacillus subtilis* and for synthesis of oligosaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 120: 274–278.
- [9] Lu LL, Li ZY, Xiao M. Recent progress on galacto-oligosaccharides synthesis by microbial, β -galactosidase — a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7): 980–985.
- [10] Jayamuthunagai J, Srisowmeya G, Chakravarthy M, Gautam P. D-tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. *Bioresource Technology*, 2017, 235: 250–255.
- [11] Liu JJ, Zhang GC, Kwak S, Oh EJ, Yun EJ, Chomvong K, Cate JHD, Jin YS. Overcoming the thermodynamic equilibrium of an isomerization reaction through oxidoreductive reactions for biotransformation. *Nature Communications*, 2019, 10: 1356.
- [12] Shin KC, Sim DH, Seo MJ, Oh DK. Increased production of food-grade D-tagatose from D-galactose by permeabilized and immobilized cells of *Corynebacterium glutamicum*, a GRAS host, expressing D-galactose isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(43): 8146–8153.
- [13] Craven GR, Steers E, Anfinsen CB. Purification, composition, and molecular weight of the beta-galactosidase of *Escherichia coli* k12. *The Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240: 2468–2477.
- [14] Yoon SH, Kim P, Oh DK. Properties of L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* as biocatalyst for tagatose production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2003, 19(1): 47–51.
- [15] 张留权. 联合 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶酶法合成 D-塔格糖的研究. 华东理工大学硕士学位论文, 2012.
- [16] Zheng ZJ, Xie JX, Liu P, Li X, Ouyang J. Elegant and efficient biotransformation for dual production of d-tagatose and bioethanol from cheese whey powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(3): 829–835.
- [17] Kim JH, Lim BC, Yeom SJ, Kim YS, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim SW, Oh DK. Differential selectivity of the *Escherichia coli* cell membrane shifts the equilibrium for the enzyme-catalyzed isomerization of galactose to tagatose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 74(8): 2307–2313.
- [18] Lim BC, Kim HJ, Oh DK. High production of D-tagatose by the addition of boric acid. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(4): 824–828.
- [19] 刘新颖. 大肠杆菌工程菌发酵乳糖制备 D-塔格糖的研究. 山东大学硕士学位论文, 2014.
- [20] Zhan YJ, Xu Z, Li S, Liu XL, Xu L, Feng XH, Xu H. Coexpression of β -D-galactosidase and L-arabinose isomerase in the production of D-tagatose: a functional sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(11): 2412–2417.

One-step synthesis of lactose to tagatose by co-expressing β -galactosidase and arabinose isomerase

Zhiyue Li¹, Xian Zhang¹, Zhiming Rao^{1,2}, Rongzhen Zhang^{1*}

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

² National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To achieve the high-efficiency synthesis of lactose to tagatose in one-step, we cloned β -galactosidase gene (*lacZ*) and arabinose isomerase gene (*araA*) from *Escherichia coli* K-12 genome and co-expressed in *E. coli* BL21(DE3). [Methods] The *araA* and *lacZ* genes were amplified from the *E. coli* K-12 genome by PCR. The two genes with SD-AS sequence as a linker were cloned into the expression vector pET28a-1 to get the recombinant plasmid pET28a-*araA-lacZ*, which was transformed into the competent cells of *E. coli* BL21(DE3) to obtain *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ*. The synthesis conditions of tagatose by whole cells of *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* were optimized and the process was scaled up. [Results] The *araA* and *lacZ* genes were efficiently co-expressed in *E. coli* BL21 simultaneously. The optimal conditions for the synthesis of tagatose by the whole cells of *E. coli* BL21/pET28a-*araA-lacZ* were determined: pH 8.0, 50 °C, 5 mmol/L Mn²⁺, 0.5 mol/L borate and 0.1% SDS as permeabilizing agent. Under these optimal conditions, the highest yield of tagatose was 24.03±2.03 g/L with a molar conversion rate of 45.67 % using 100 g/L lactose as substrate. The yield of tagatose was increased with the increasment of the substrate lactose concentration. The yield of tagatose was 83.81±1.38 g/L with 500 g/L lactose as substrate. [Conclusion] The genes *lacZ* and *araA* coding two target enzymes were co-expressed in *E. coli* BL21 to realize the efficient synthesis of high valued rare sugar tagatose from the cheap substrate lactose in one step. This research has laid a good research foundation for the preparation of low-energy functional sugars by biological methods.

Keywords: β -galactosidase, arabinose isomerase, tagatose, lactose, biocatalysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0900300), by the National Natural Science Foundation of China (31970045), by the National First-Class Discipline Program of Light Industry Technology and Engineering (LITE2018-12), by the Program of Introducing Talents of Discipline to Universities (111-2-06), by the Top-Notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions and by the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2020BFH02011)

*Corresponding author. Tel: +86-510-85197760; Fax: +86-510-85918201; E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

Received: 3 December 2020; Revised: 24 March 2021