



# 塔格糖-4-异构酶的新酶挖掘及酶学性质研究

王利飞<sup>1,2</sup>, 谭子斌<sup>2,3</sup>, 谢希贤<sup>1</sup>, 朱蕾蕾<sup>2\*</sup>

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

3 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

王利飞, 谭子斌, 谢希贤, 朱蕾蕾. 塔格糖-4-异构酶的新酶挖掘及酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4197-4207.

WANG Lifei, TAN Zijian, XIE Xixian, ZHU Leilei. Discovery and characterization of a novel tagatose-4-epimerase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4197-4207.

**摘要:** D-塔格糖是一种己酮糖, 在自然界中天然存在但含量极少, 具有降血糖、抗龋齿、改善肠道菌群、促进血液循环和抗衰等作用, 可广泛应用于食品、医药和化妆品行业。目前酶催化半乳糖生成塔格糖仅需一步反应, 简单易行, 但半乳糖较高的成本限制了这一方法的工业应用。果糖是塔格糖的同分异构体, 价格低廉, 来源稳定, 可通过 4 位差向异构化一步获得塔格糖, 是产塔格糖的理想底物。【目的】因此挖掘新的塔格糖-4-差向异构酶对塔格糖的工业生产具有重要意义。【方法】本文通过基因挖掘的手段发现了热袍菌(*Thermotoga bacterium*)来源的未知功能蛋白(命名为 HCZ0)具有塔格糖-4-差向异构酶活性, 进而完成了 HCZ0 的异源表达、纯化及酶学性质表征。【结果】确定 HCZ0 表观分子量约为 57.9 kDa, 比活力为 0.9 U/mg, 最适反应温度和 pH 值分别为 70 °C 和 9.0, 最适金属离子为 Ni<sup>2+</sup>, 最适金属离子浓度为 2 mmol/L, 60、70 和 80 °C 半衰期分别为 180、67 和 9 h。最适条件下, HCZ0 催化 200 g/L 果糖在 2 h 内可产生 28 g/L 塔格糖。【结论】本研究中, HCZ0 是碱性高温酶, 且具有较好的热稳定性, 这些特征在以后的理论研究及工业生产中具有一定的科学价值。

**关键词:** D-塔格糖; 塔格糖-4-差向异构酶; 果糖异构化; D-果糖

资助项目: 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-KJGG-003-23)

This work was supported by the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Action (TSBICIP-KJGG-003-23).

\*Corresponding author. Tel: +86-22-24828796, E-mail: zhu\_ll@tib.cas.cn

Received: 2023-03-19; Accepted: 2023-07-14; Published online: 2023-07-27

# Discovery and characterization of a novel tagatose-4-epimerase

WANG Lifei<sup>1,2</sup>, TAN Zijian<sup>2,3</sup>, XIE Xixian<sup>1</sup>, ZHU Leilei<sup>2\*</sup>

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu, China

**Abstract:** D-tagatose is a natural and rare ketohexose with blood glucose-lowering, anti-caries, gut microbiome-regulating, blood circulation-promoting, and anti-aging activities, and thus it is widely applied in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. Though the enzymatic conversion of galactose into tagatose is a simple process, the high cost of galactose limits its industrial application. Fructose, an isomer of tagatose, is an economical alternative with stable supply. Through 4-epimerization, tagatose can be produced from fructose, which is an ideal substrate for tagatose production. **[Objective]** To discover new tagatose-4-epimerases essential for the efficient industrial production of tagatose. **[Methods]** Gene mining was performed to identify an unknown protein HCZO with 4-epimerization activity from *Thermotoga bacterium*. HCZO was heterologously expressed, purified, and characterized. **[Results]** HCZO had a molecular weight of 57.9 kDa and the specific activity of 0.9 U/mg. The enzyme showed the highest activity at 70 °C and pH 9.0, and its activity was significantly improved by 2 mmol/L Ni<sup>2+</sup>. HCZO exhibited the half-life of 180, 67, and 9 h at 60, 70, and 80 °C, respectively. Under optimal conditions, the HCZO was able to catalyze 200 g/L fructose to produce 28 g/L tagatose within 2 h. **[Conclusion]** HCZO is an alkaline high-temperature enzyme with good thermal stability, which can provide inspiration for future theoretical research and industrial production.

**Keywords:** D-tagatose; tagatose-4-epimerase; fructose isomerization; D-fructose

D-塔格糖由于具有良好的理化特性及生物学功能广泛受到人们的喜爱<sup>[1]</sup>。经研究发现，D-塔格糖是一种热量极低的糖，口感与蔗糖非常接近，甜度为蔗糖的 90%<sup>[2]</sup>，但塔格糖具有的热量约为蔗糖的三分之一(塔格糖和蔗糖的热量分别为 1.5 kcal/g 和 4 kcal/g)<sup>[3]</sup>，是理想的蔗糖替代品。D-塔格糖最先是由 Bruyn 和 Ekenstein 于 1897 年研究温和碱对 D-半乳糖的影响时发现的<sup>[4]</sup>，它是一种还原己酮糖<sup>[5]</sup>，分别是 D-果糖和 D-半乳糖的差向异构体和同分异构体。在新兴的营养食品中，D-塔格糖由于具有预防肥胖<sup>[6]</sup>、降

血糖<sup>[7]</sup>、防龋齿<sup>[8]</sup>和益生等生理功能，可应用于烘焙食品、巧克力、牛奶饮料、酸奶和糖果等食品生产过程中<sup>[9]</sup>。D-塔格糖除了在食品行业应用较广外，在医药行业也有非常好的应用前景。D-塔格糖可以通过抑制小肠黏膜上的部分转运酶来抑制肥胖，同时由于在摄入 D-塔格糖时只有 15%–20%能被小肠吸收<sup>[10]</sup>，因此可作为糖尿病患者饮食的甜味剂。当 D-塔格糖被小肠部分吸收后，其余的塔格糖则被结肠中的肠道菌群发酵，具有很好的益生作用<sup>[11]</sup>，有利于肠道健康。但是 D-塔格糖在天然食品物质中存在的量非常

少<sup>[12]</sup>, 通过提取法生产塔格糖比较困难。目前 D-塔格糖生产主要依靠人工合成, 通常有化学和生物转化 2 种合成方法<sup>[13]</sup>。

化学合成 D-塔格糖是以半乳糖为底物, 碱金属盐作为催化剂, 使半乳糖与金属氢氧化物发生异构化反应, 生成金属氢氧化物-塔格糖复合物中间体沉淀, 再用酸中和<sup>[14]</sup>。在中和过程中, 酸与 D-塔格糖反应生成不溶性盐, 通过过滤、纯化使塔格糖分离出来。化学法生产 D-塔格糖成本高, 纯化步骤复杂, 产物纯度低<sup>[15]</sup>, 并且会有化学废物和副产物形成。因此, 酶催化的生物法合成 D-塔格糖成为相关领域的研究重点, 如 D-半乳糖通过 L-阿拉伯糖异构酶将 D-半乳糖转化为 D-塔格糖; D-山梨糖通过 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶转化成 D-塔格糖; 半乳糖醇 2-脱氢酶以 D-半乳糖醇为底物, 实现 D-塔格糖的生成<sup>[16]</sup>。但由于这几种酶方法受到底物昂贵、价格不稳定的限制<sup>[17]</sup>, 因此缺乏工业应用价值。与 D-半乳糖、D-山梨糖和半乳糖醇相比, D-果糖供应更稳定, 成本更低, 是生产 D-塔格糖的理想底物。

2017 年, Lee 等<sup>[18]</sup>首次以果糖为底物通过己糖激酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶和植酸酶的三步酶联级反应产塔格糖: 再将含有塔格糖和果糖的反应混合物通过乙醇重结晶纯化为高纯度的塔格糖。这种方法步骤较为繁琐, 限制因素较多。此后, 韩国建国大学的 Oh 教授团队<sup>[19]</sup>通过对石生嗜热袍菌 (*Thermotoga petrophila*) 来源的 D-tagaturonate epimerase (UxaE) 进行定向改造使

其获得塔格糖-4-差向异构活性, 从而可以直接将 D-果糖转化为 D-塔格糖。塔格糖-4-差向异构酶催化果糖转化为塔格糖的过程如图 1 所示。这种利用塔格糖-4-差向异构酶直接将果糖一步转化为塔格糖的方法成本低廉, 为 D-塔格糖的经济商业化生产提供了一条理想的途径。但是受限于较低的酶活力, 目前仍难以满足工业需求。因此, 新的塔格糖-4-差向异构酶的鉴定与活性改造工作非常重要。由于目前没有发现天然的塔格糖-4-差向异构酶, 新阿波罗栖热袍菌 (*Thermotoga neapolitana*) 来源的 D-tagaturonate epimerase (UxaE) 被证实经过氨基酸突变可以获得的塔格糖-4-差向异构的活性<sup>[3]</sup>, 因此本研究以该 UxaE 的氨基酸序列作为模板进行 BLAST 搜索, 本文使用 BLASTp 功能对塔格糖-4-差向异构酶进行新基因挖掘, 并将重组质粒转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 进行表达, 对目标酶纯化后进一步进行酶学性质研究, 进而对其催化果糖到塔格糖的过程进行优化, 从而为塔格糖-4-差向异构酶转化果糖为塔格糖的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

#### 1.1.1 菌株和质粒

表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 与 pET21a (+) 质粒由本实验室保存; 含有塔格糖-4-差向异构酶基因的重组质粒 pET21a-*mbn1*、pET21a-*hcz0* 委托中国科学院天津工业生物技术研究所合成。

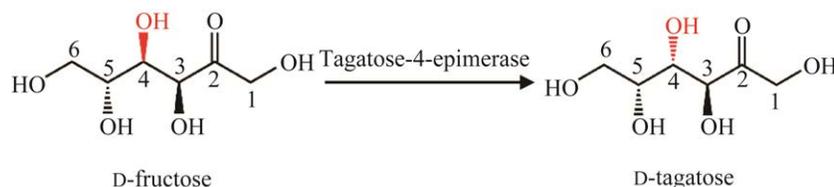


图 1 塔格糖-4-差向异构酶催化果糖向塔格糖转化示意图

Figure 1 Schematic diagram of tagatose-4-epimerase catalyzed the conversion of fructose to tagatose.

### 1.1.2 培养基

Luria-Bertani (LB)液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂粉 2。

### 1.1.3 试剂

氨苄青霉素(ampicillin, Amp)购自北京兰博利德商贸有限公司、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

## 1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 液相色谱仪,戴安中国有限公司;酶标仪,Molecular Devices 公司;Mastercycler Personal PCR 仪, Eppendorf 公司; Quantum ST5 凝胶成像系统, Viber 公司;真空冷冻干燥机,博医康(北京)仪器有限公司;恒温摇床,上海知楚仪器有限公司;高压灭菌锅,上海伯能仪器有限公司。

## 1.3 塔格糖-4-异构酶的基因挖掘

以来源于 *T. neapolitana* 的 UxaE 氨基酸序列为模板,使用 BLASTp 功能在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的非冗余蛋白质序列数据库中进行检索,选择序列一致性靠前的 100 条序列。使用 MEGA 软件进行多序列比对,去除不合群序列。使用邻接法将剩余序列构建系统发育树。选用步长检验的检验方法,设置检验次数为 1 000。距离模型选择 p-distance,部分删除多序列比对中含有空位的列。最终得到的步长检验合并树大多数的节点可信度大于 70%。进而通过考虑分支、序列和来源等因素选择 2 条候选塔格糖异构酶序列分别命名为 HCZ0、MBN1。

## 1.4 塔格糖-4-差向异构酶的表达与纯化

将塔格糖差向异构酶表达载体 pET21a-hcz0, pET21a-mbn1 转入 *E. coli* BL21(DE3)中,涂布平

板,过夜培养长出单克隆菌落。挑取单菌落于 20 mL LB 培养基中培养过夜(12–16 h),以 1% (体积分数)的接种量接种到 1 L LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 摇床培养至  $OD_{600}=0.6-0.8$ ,加入诱导剂 IPTG,使其终浓度为 0.1 mmol/L,20 °C 继续培养 24 h。培养完成后,使用 5 000 r/min 低温高速离心机收集菌体,去除上清。去离子水重悬洗涤菌体 2 次,除去残余 LB 成分。用适当体积 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 值 8.0)重悬并用高压均质仪在 1 000 bar 压力下破碎菌体,破碎时间为 5–10 min。之后使用 12 000 r/min 低温高速离心机收集上清的可溶性粗酶液。将粗酶液用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤处理后,使用 Ni Sepharose 6 Fast Flow His 标签蛋白纯化填料自填装镍柱为层析柱;缓冲系统 A 液: 10 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0);B 液:250 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L NaCl 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)。使用 AKTA 仪器进行纯化,利用不同浓度的咪唑进行梯度洗脱获得纯化蛋白。为降低咪唑对蛋白的影响,将纯化后的蛋白再经脱盐柱处理,除去咪唑后采用二辛可宁酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)测定蛋白浓度。纯酶液最终保存在 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 9.0)中。

## 1.5 塔格糖-4-差向异构酶的活性测定

塔格糖和果糖浓度标准曲线的制定:先配制浓度为 120 g/L 的塔格糖母液和 400 g/L 的果糖母液,再稀释成一系列浓度的塔格糖和果糖标准液,通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测并绘制标曲。检测条件为:色谱柱 Water Sugar-Pak<sup>TM</sup>I,流动相 ddH<sub>2</sub>O,流速 0.4 mL/min,柱温 80 °C,示差折光检测器;上样量为 20  $\mu$ L。

HCZ0 酶活的测定:70  $\mu$ L 的果糖溶液(终浓度 50 g/L)与 70  $\mu$ L 的 HCZ0 酶液混合均匀后,置于 70 °C 反应 90 min 后,加入 5  $\mu$ L 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

终止反应。冷却至室温,反应液经 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤后通过 HPLC 检测塔格糖产量。

比酶活的测定: 70  $\mu\text{L}$  的果糖溶液(终浓度 100 g/L)与 70  $\mu\text{L}$  的 HCZO 酶液或 UxaE 酶液分别混合均匀后,置于 70  $^{\circ}\text{C}$  反应 15 min 后,加入 5  $\mu\text{L}$  10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。冷却至室温,反应液经 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤后通过 HPLC 检测塔格糖产量。

酶活力单位定义为: 每分钟转化果糖生成 1  $\mu\text{mol}$  塔格糖的酶量。

### 1.6 酶催化反应的最适 pH 测定

塔格糖-4-差向异构酶在碱性环境中活性较高<sup>[19]</sup>,因此选用偏碱性的缓冲液检测其最适 pH。用 50 mmol/L 的不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 值 8.0–9.0)以及碳酸盐缓冲液(pH 值 9.5–11.0)配制果糖溶液,并稀释酶液,在 70  $^{\circ}\text{C}$  下根据 1.5 方法测定不同 pH 条件下的酶活力,绘制最适 pH 曲线。

### 1.7 酶催化反应的最适温度和温度稳定性研究

将 1.5 中的酶活力测定温度设置为 50–90  $^{\circ}\text{C}$  范围内的 5 个温度,分别测定酶活力,绘制酶活力随温度变化曲线。酶催化的温度稳定性则将蛋白定量到 1 mg/mL,取 500  $\mu\text{L}$  的纯酶液分别置于 60、70 和 80  $^{\circ}\text{C}$  金属浴加热不同时间,测定其残余活性并绘制热失活曲线来研究。

### 1.8 金属离子、金属离子浓度对塔格糖-4-差向异构酶酶活的影响

配制  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  金属离子溶液,加入酶催化的反应体系,使得金属离子终浓度为 1 mmol/L,检测不同金属离子对酶活的影响。设置最适金属离子终浓度为 0.5、1、2、4 和 5 mmol/L 的反应体系,检测该金属离子的浓度对酶活的影响,并确定最适金属离子的反应最佳浓度。

### 1.9 塔格糖-4-差向异构酶 HCZO 动力学参数测定

使用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, 2 mmol/L

$\text{NiCl}_2$ , pH 值 9.0)将塔格糖-4-差向异构酶液稀释到 1 mg/mL。在 1.5 mL EP 管中加入 70  $\mu\text{L}$  酶溶液,再加入等体积的一系列不同浓度的果糖溶液。在金属振荡器 70  $^{\circ}\text{C}$  下反应,分别设置不同的反应时间。反应结束后,按照 1.5 条件中的液相检测条件进行检测,并进行动力学曲线的拟合和动力学参数的计算。初始速率数据拟合变构 Hill 方程  $v = V_{\text{max}} \times S^n / (K_{\text{half}}^n + S^n)$ , 式中:  $v$  为初始速度;  $S$  为底物浓度;  $V_{\text{max}}$  为最大速度;  $K_{\text{half}}$  为占据一半活性位点的配体浓度(半饱和浓度);  $n$  为 Hill 系数。

### 1.10 塔格糖-4-差向异构酶 HCZO 转化率测定

使用 Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, 2 mmol/L  $\text{NiCl}_2$ , pH 值 9.0)将塔格糖-4-差向异构酶液稀释到 36 mg/mL,在 1.5 mL EP 管中加入 70  $\mu\text{L}$  酶溶液,再加入等体积的 400 g/L 果糖溶液。在金属振荡器 70  $^{\circ}\text{C}$  下反应,每间隔 1 h 取样,直至转化率达到最大。反应结束后,按照 1.5 条件中的液相检测条件检测塔格糖产量与果糖剩余量,并计算转化率。

## 2 结果与分析

### 2.1 塔格糖-4-差向异构酶的挖掘

自然界未发现天然的塔格糖-4-差向异构酶,已知 *T. neapolitana* 来源的 UxaE 经过氨基酸突变可以获得的塔格糖-4-差向异构的活性<sup>[3]</sup>,因此本研究以该 UxaE 的氨基酸序列作为模板进行 BLAST 搜索,对获得的蛋白序列构建系统进化树(图 2)。选择了与模板序列距离较近和较远的 2 条嗜热菌来源的新蛋白在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达并验证功能,分别将 2 个蛋白称为 MBN1 (来源于 *Thermoflexales bacterium* 的假定蛋白)和 HCZO (来源于热袍菌(*Thermotogae bacterium*)的假定蛋白)。MBN1 和 HCZO 的理论分子量分别为 53.1 kDa 和 57.9 kDa,与 UxaE 的序列一致性分别为 44%和 48%。

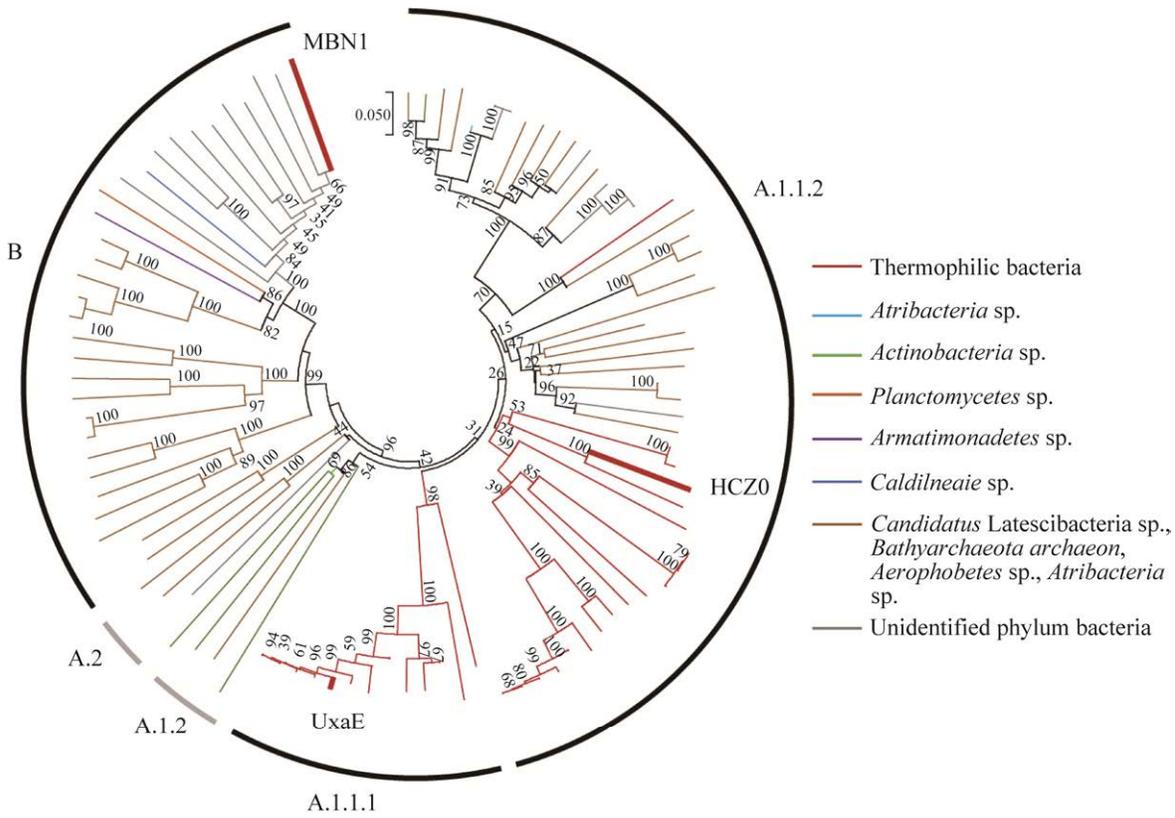


图2 以 *Thermotoga neapolitana* 来源的 UxaE 的氨基酸序列为模板进行 BLAST 搜索获得的蛋白序列构建系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of protein sequences obtained by BLAST search using UxaE as query sequence.

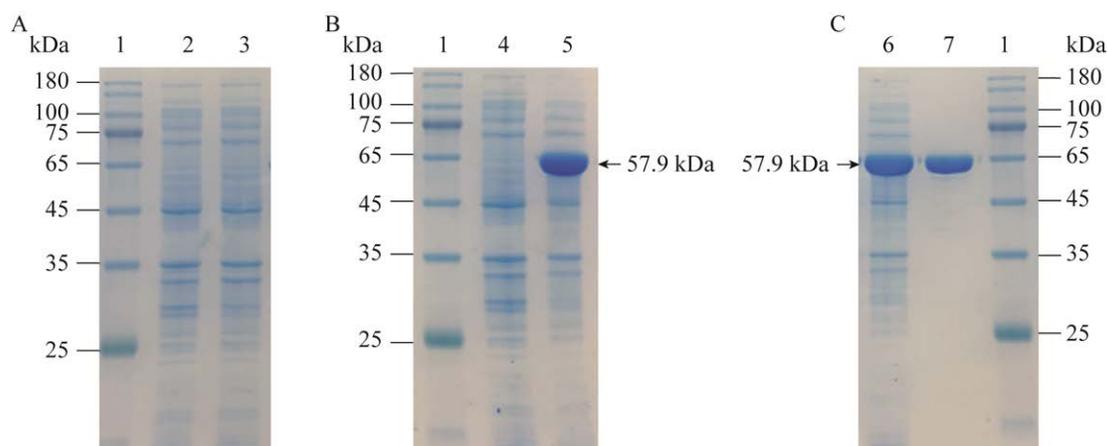
## 2.2 塔格糖-4-差向异构酶的表达纯化

首先通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析 MBN1 和 HCZO 在 *E. coli* BL21(DE3)中的可溶性表达情况。根据图 3A 可知, 候选酶 MBN1 与 pET21a(+)空载相比, 在 45–65 kDa 之间没有看到条带表达, 因此判断 MBN1 在 *E. coli* BL21(DE3)中无可溶性表达; 根据图 3B 可知, 与 pET21a(+)空载相比, HCZO 在分子量 45–65 kDa 处有明显条带, 大小与理论分子量(57.9 kDa)一致, 因此判断 HCZO 在 *E. coli* BL21(DE3)中可溶性表达较好。进一步通过 AKTA 纯化, 获得了纯度较高的 HCZO 纯酶(图

3C), 可用于接下来的酶学性质研究。

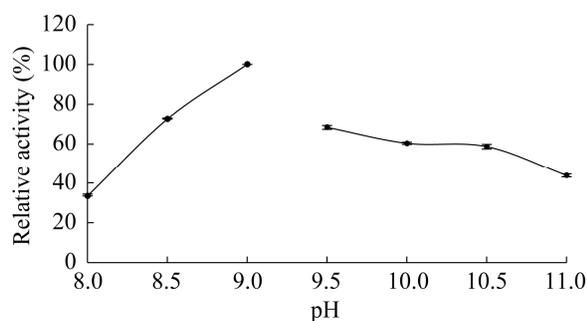
## 2.3 反应最适 pH

分别在 pH 值 8.0–11.0 条件下进行 HCZO 催化果糖转化为塔格糖的试验, 发现该酶可以将果糖转化为塔格糖, 因此命名为塔格糖-4-差向异构酶 HCZO。以 pH 值 9.0 时的最高活性为 100% 分别计算其他 pH 值条件下的相对活性。结果如图 4 所示: pH 值 8.0–9.0 时, HCZO 催化果糖转化为塔格糖的酶活力随着 pH 值的升高而增加, pH 值 9.0 时达到最大酶活力, pH 值 9.5–11.0 时酶活力随着 pH 值的升高而降低, 但下降缓慢。由此可知, HCZO 更适宜在偏碱性环境下催化果糖转化为塔格糖。



**图 3 SDS-PAGE 分析 MBN1 (A)和 HCZ0 (B)的可溶性表达与 HCZ0 的纯化(C)**

Figure 3 SDS-PAGE analysis of soluble expression of MBN1(A) and HCZ0 (B), and the purification efficiency of HCZ0 (C). 1: Protein Marker; 2: pET21a(+); 3: pET21a-MBN1 crude enzyme supernatant; 4: pET21a (+); 5: pET21a-HCZ0 crude enzyme supernatant; 6: HCZ0 crude enzyme supernatant; 7: Purified HCZ0 enzyme.

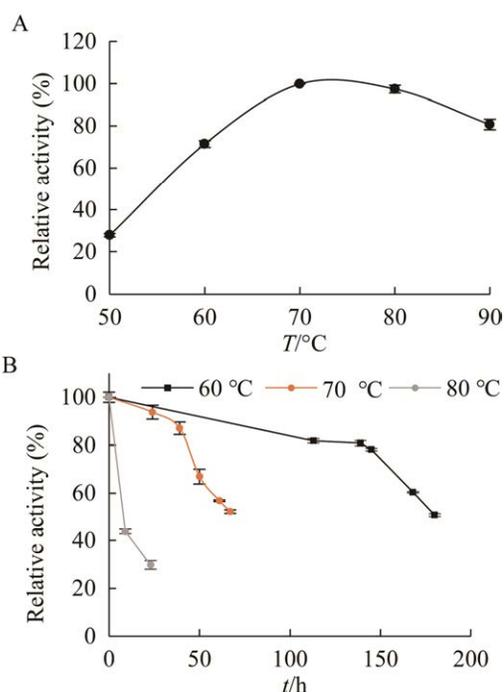


**图 4 HCZ0 酶活力随反应 pH 的变化**

Figure 4 The enzyme activity of HCZ0 changes with reaction pH.

#### 2.4 最适温度和温度稳定性

在最适 pH 值 9.0, 反应温度 50–90 °C 的条件下, 利用 HCZ0 催化果糖转化, 检测塔格糖产量并计算酶活力。由图 5A 可知, 50–70 °C, 随着温度的升高, HCZ0 催化果糖转化为塔格糖的酶活力呈上升趋势, 在 70 °C 达到最高; 温度继续升高, 酶活力则呈下降趋势。因此 HCZ0 催化果糖转化为塔格糖的最适反应温度为 70 °C。为了进一步检测 HCZ0 的温度稳定性, 将 HCZ0



**图 5 HCZ0 催化活力随反应温度变化曲线(A)和 60、70 和 80 °C 热稳定性曲线(B)**

Figure 5 The curve of changes in catalytic activity of HCZ0 with respect to reaction temperature (A) and thermal stability curve at 60, 70, and 80 °C (B).

纯酶液在 60、70 和 80 °C 孵育不同时间检测其剩余活性。发现 HCZ0 在 60 °C 和 70 °C 具有较好的耐热性,由图 5B 可知 60 °C 孵育 113 h,酶活力仅下降 18%,孵育 113–145 h 酶活力维持稳定,继续热孵育至 168 h 仍剩余 60%的活性。孵育 180 h 时酶活力下降至 51%,可知 HCZ0 在 60 °C 的半衰期大致为 180 h。在 70 °C 孵育 39 h 后,相对活性剩余 87%,继续孵育至 61 h,活性剩余 57%。孵育至 67 h 时,相对活性为初始活性的 52%,因此判断在 70 °C 的半衰期约为 67 h。当酶在 80 °C 孵育时,孵育 9 h 后活性降为初始活性的 44%,因此判断在 80 °C 的半衰期略小于 9 h。

## 2.5 最适金属离子和最适金属离子浓度

金属离子经常作为酶促反应的辅助因子,因此在酶促反应过程中经常添加某些金属离子来促进酶促反应的进行<sup>[20]</sup>。在果糖异构化酶促反应中添加各种金属离子,检测 HCZ0 活性。从表 1 可以看出,HCZ0 催化果糖异构化为塔格糖的反应依赖金属离子的激活作用,其中 Ni<sup>2+</sup>对 HCZ0 酶活力的激活作用最强,产塔格糖量为 2.752 2 g/L。Mn<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>对酶活性的激活作用次之,产塔格糖量分别为 0.479 8 g/L 和 0.282 3 g/L, Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>对酶的激活作用最小,产塔格糖量分别为 0.047 0 g/L 和 0.050 0 g/L。因此,HCZ0 催化果糖异构化为塔格糖的最适金属离子是 Ni<sup>2+</sup>。

表 1 不同金属离子对 HCZ0 酶活性的影响

Table 1 The effect of different metal ions on HCZ0 enzymatic activity

Metal ions	Yield of tagatose (g/L)
None	0.000 0±0.000 0
Ca <sup>2+</sup>	0.047 0±0.000 1
Zn <sup>2+</sup>	0.282 3±0.007 6
Ni <sup>2+</sup>	2.752 2±0.017 9
Mn <sup>2+</sup>	0.479 8±0.001 0
Mg <sup>2+</sup>	0.050 0±0.000 1

为了进一步研究 Ni<sup>2+</sup>浓度对酶活性的影响,检测了添加 5 种不同浓度 Ni<sup>2+</sup>时 HCZ0 的酶活力。结果如图 6 所示,在 Ni<sup>2+</sup>浓度 0–2 mmol/L 范围内,HCZ0 酶活力随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加而提高, Ni<sup>2+</sup>浓度为 2–5 mmol/L 范围内时,HCZ0 酶活力随着 Ni<sup>2+</sup>浓度增加而降低。因此 HCZ0 催化目标反应的最佳 Ni<sup>2+</sup>浓度是 2 mmol/L。

## 2.6 塔格糖-4-差向异构酶 HCZ0 的动力学参数

为了表征塔格糖-4-差向异构酶 HCZ0 的动力学参数表征,按照 1.9 方法检测了不同底物浓度下的反应初速度,并使用 GraphPad Prism 软件对动力学曲线进行拟合和分析。经过计算,HCZ0 的动力学参数如表 2 所示,  $k_{cat}$  为 15.32 min<sup>-1</sup>,  $k_{cat}/K_{half}$  为 99.566 L/(min·mol)。

## 2.7 塔格糖-4-差向异构酶 HCZ0 转化率

在最优反应条件(反应温度 70 °C、pH 值 9.0、2 mmol/L Ni<sup>2+</sup>)下进行反应,检测塔格糖-4-差向异构酶 HCZ0 的底物转化率,结果如图 7 所示,

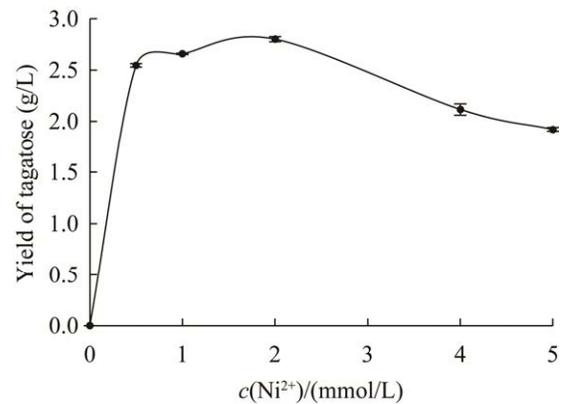


图 6 不同 Ni<sup>2+</sup>浓度条件下 HCZ0 的相对酶活力

Figure 6 The relative enzymatic activity of HCZ0 under different Ni<sup>2+</sup> concentrations.

表 2 HCZ0 的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of HCZ0

Enzyme	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$K_{half}$ (mol/L)	$k_{cat}/K_{half}$ (L/(min·mol))
HCZ0	15.32±0.27	0.154±0.002	99.566±0.751

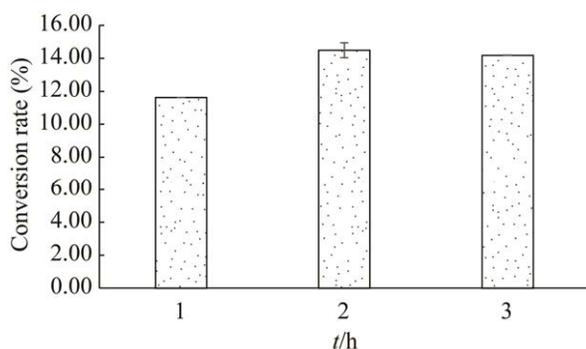


图7 HCZ0在优化条件下的转化率

Figure 7 The conversion rate of HCZ0 in the optimized condition.

当酶量终浓度为 18 mg/mL 时, HCZ0 在 2 h 内催化 200 g/L 果糖生成 28 g/L 塔格糖, 最大转化率为 14%, 产率为 14 g/(L·h)。据此数据计算得出的反应平衡常数为 0.17。

## 2.8 塔格糖-4-差向异构酶 HCZ0 和 UxaE 比酶活比较

在酶量终浓度为 0.5 mg/mL、果糖终浓度为 100 g/L 的条件下测定 HCZ0 和 UxaE 的比酶活。结果显示, 来源于 *T. neapolitana* 的 UxaE 经分子改造后的最佳突变体 10V 和 HCZ0 的比酶活分别为 1.7 U/mg 和 0.9 U/mg。

## 3 讨论与结论

D-塔格糖是一种具有多种生理功能的稀有糖, 更是一种非常具有前景的功能甜味剂<sup>[21-22]</sup>。酶法作为生产塔格糖的主要途径, 成本较低、产物纯度高, 必将成为一种趋势。D-果糖作为 D-塔格糖的 C-4 差向异构体, 市场供应量大, 将 D-果糖用于 D-塔格糖的合成, 可以进一步降低酶法生产 D-塔格糖的成本<sup>[23]</sup>。因此酶催化的 C-4-差向异构反应对于塔格糖的合成十分重要。然而在以果糖为底物的酶法催化合成策略中, 关于 C-4-差向异构酶的研究较少, 需要对 C-4-差向异构新酶的发掘进行研究。

本研究分别选择了与模板 UxaE 序列<sup>[3]</sup>距离较近和较远的 2 条嗜热菌来源的新酶基因在 *E. coli* BL21(DE3) 中表达并验证功能, 发现了与模板序列距离较近的新酶 HCZ0 具有塔格糖-4-差向异构活性, 能够有效地催化廉价底物果糖转化为塔格糖。本研究也检测了来源于 *T. neapolitana* 的 UxaE 经分子改造后的最佳突变体 10V 和 HCZ0 的比酶活, 分别为 1.7 U/mg 和 0.9 U/mg。来自 *T. petrophila* 的塔格糖-4-差向异构野生酶活力为 0.000 6 U/mg, 分子改造后最佳突变体 5V 的比活力为 0.12 U/mg<sup>[19]</sup>。因此, HCZ0 与已报道具有活性的野生酶相比具有更高的改造潜力。此外, 与其他酶法生产塔格糖途径中的关键酶相比, HCZ0 更优良的热稳定性使其具有更好的工业化应用前景, 在 60 °C 下孵育 113 h 后, 活性为初始活性的 82%。而催化果糖-6-磷酸生产塔格糖途径的关键酶塔格糖 1,6-二磷酸醛缩酶在 60 °C 下孵育 30 h 后, 相对活性为初始活性的 70%<sup>[24]</sup>。本研究中对 HCZ0 催化果糖转化为塔格糖的反应温度、pH、金属离子种类和最佳金属离子浓度进行的一系列优化也为其进一步改造与应用奠定了基础。优化条件后, HCZ0 可催化 200 g/L 果糖在 2 h 内生成 28 g/L 塔格糖, 转化率为 14%, 产率为 14 g/(L·h)。

## 参考文献

- [1] FUJIMARU T, PARK JH, LIM J. Sensory characteristics and relative sweetness of tagatose and other sweeteners[J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(9): S323-S328.
- [2] ADACHI S, MIYAGAWA Y, KOBAYASHI T. Production of tagatose from galactose in a batch-type reactor using a phosphate buffer under subcritical water conditions[J]. *Food Science and Technology Research*, 2020, 26(6): 695-699.
- [3] 梁成才, 李英美, 朴逸香, 李赞炯, 赵显国, 金成甫, 金良姬, 朴承源. 具有改良的 D-塔格糖转化活性的

- 己糖醛酸酯 C4-差向异构酶变异体和用它制造 D-塔格糖的方法: CN108884454A[P]. 2018-11-23.
- YANG SJ, LEE YM, PARK IH, LEE CH, CHO HK, KIM SB, KIM YH, PARK SW. Hexuronate C4-epimerase variant having improved D-tagatose conversion activity, and D-tagatose production method using same: CN108884454A[P]. 2018-11-23 (in Chinese).
- [4] BAPTISTA SL, ROMANÍ A, OLIVEIRA C, FERREIRA S, ROCHA CMR, DOMINGUES L. Galactose to tagatose isomerization by the L-arabinose isomerase from *Bacillus subtilis*: a biorefinery approach for *Gelidium sesquipedale* valorisation[J]. *LWT*, 2021, 151: 112199.
- [5] HAN PP, WANG XY, LI YJ, WU H, SHI T, SHI JF. Synthesis of a healthy sweetener D-tagatose from starch catalyzed by semiartificial cell factories[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(8): 3813-3820.
- [6] CHAHED A, NESLER A, AZIZ A, BARKA EA, PERTOT I, PERAZZOLLI M. A review of knowledge on the mechanisms of action of the rare sugar D-tagatose against phytopathogenic oomycetes[J]. *Plant Pathology*, 2021, 70(9): 1979-1986.
- [7] CAMPBELL HR, ALSHARIF FM, MARSAC PJ, LODDER RA. The development of a novel pharmaceutical formulation of D-tagatose for spray-drying[J]. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 2022, 17(1): 194-206.
- [8] MAYUMI S, KUBONIWA M, SAKANAKA A, HASHINO E, ISHIKAWA A, IJIMA Y, AMANO A. Potential of prebiotic D-tagatose for prevention of oral disease[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 767944.
- [9] GUERRERO-WYSS M, DURÁN AGÜERO S, ANGARITA DÁVILA L. D-tagatose is a promising sweetener to control glycaemia: a new functional food[J]. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 8718053.
- [10] CORNEO PE, NESLER A, LOTTI C, CHAHED A, VRHOVSEK U, PERTOT I, PERAZZOLLI M. Interactions of tagatose with the sugar metabolism are responsible for *Phytophthora infestans* growth inhibition[J]. *Microbiological Research*, 2021, 247: 126724.
- [11] YOSHIDA H, YAMADA M, NISHITANI T, TAKADA G, IZUMORI K, KAMITORI S. Crystal structures of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and its complexes with D-tagatose and D-fructose[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(2): 443-453.
- [12] ZHANG SS, GUO TT, XIN YP, QIN LH, KONG J. Biotechnological production of D-tagatose from lactose using metabolically engineering *Lactiplantibacillus plantarum*[J]. *LWT*, 2021, 142: 110995.
- [13] SOKOŁOWSKA E, SADOWSKA A, SAWICKA D, KOTULSKA-BĄBLIŃSKA I, CAR H. A head-to-head comparison review of biological and toxicological studies of isomaltulose, D-tagatose, and trehalose on glycemic control[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(21): 5679-5704.
- [14] ROY S, CHIKKERUR J, ROY SC, DHALI A, KOLTE AP, SRIDHAR M, SAMANTA AK. Tagatose as a potential nutraceutical: production, properties, biological roles, and applications[J]. *Journal of Food Science*, 2018, 83(11): 2699-2709.
- [15] WANG ZH, WANG MM, LYU XM, WANG CY, TONG YJ., HUA X, YANG RJ. Recycling preparation of high-purity tagatose from galactose using one-pot boronate affinity adsorbent-based adsorption-assisted isomerization and simultaneous purification[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 446: 137089.
- [16] SUCHÝ M, CHARLTON TA, BEN RN, SHUHENDLER AJ. Synthesis of natural/<sup>13</sup>C-enriched D-tagatose from natural/<sup>13</sup>C-enriched D-fructose[J]. *Carbohydrate Research*, 2021, 507: 108377.
- [17] JAYAMUTHUNAGAI J, GAUTAM P, SRISOWMEYA G, CHAKRAVARTHY M. Biocatalytic production of D-tagatose: a potential rare sugar with versatile applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(16): 3430-3437.
- [18] LEE SH, HONG SH, KIM KR, OH DK. High-yield production of pure tagatose from fructose by a three-step enzymatic cascade reaction[J]. *Biotechnology Letters*, 2017, 39(8): 1141-1148.

- [19] SHIN KC, LEE TE, SEO MJ, KIM DW, KANG LW, OH DK. Development of tagaturonate 3-epimerase into tagatose 4-epimerase with a biocatalytic route from fructose to tagatose[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(20): 12212-12222.
- [20] ZHANG LT, MU WM, JIANG B, ZHANG T. Characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts D-fructose into D-psicose[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(6): 857-862.
- [21] WILLIAMS J, SPITNALE M, LODDER R. The effect of D-tagatose on fructose absorption in a rat model[J]. Journal of Developing Drugs, 2013, 2: 1000111.
- [22] UECHI K, TAKATA G, YONEDA K, OHSHIMA T, SAKURABA H. Structure of D-tagatose 3-epimerase-like protein from *Methanocaldococcus jannaschii*[J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications, 2014, 70(Pt 7): 890-895.
- [23] DURANTE M, SGAMBELLONE S, LUCARINI L, FAILLI P, LAURINO A, COLLOTTA D, PROVENSIO G, MASINI E, COLLINO M. D-tagatose feeding reduces the risk of sugar-induced exacerbation of myocardial I/R injury when compared to its isomer fructose[J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2021, 8: 650962.
- [24] DAI YW, ZHANG JX, ZHANG T, CHEN JJ, HASSANIN HA, JIANG B. Characteristics of a fructose 6-phosphate 4-epimerase from *Caldilinea aerophila* DSM 14535 and its application for biosynthesis of tagatose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 139: 109594.