

重组大肠杆菌全细胞一步法催化乳糖合成 D-塔格糖

刘芸^{1,2#}, 乔郅钠^{1,2#}, 张恒维^{1,2}, 张显^{1,2}, 饶志明^{1,2*}

1 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

刘芸, 乔郅钠, 张恒维, 张显, 饶志明. 重组大肠杆菌全细胞一步法催化乳糖合成 D-塔格糖[J]. 生物工程学报, 2025, 41(5): 1974-1993.

LIU Yun, QIAO Zhina, ZHANG Hengwei, ZHANG Xian, RAO Zhiming. One-step whole-cell synthesis of D-tagatose from lactose catalyzed by recombinant *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(5): 1974-1993.

摘 要: D-塔格糖是一种功能性稀有糖, 因其具有热量低、降低血糖、抗龋齿和改善肠道菌群等特性而受到广泛关注。现有的生产 D-塔格糖的方法仍存在生产效率低、成本高等问题。为了解决这一问题, 本研究通过在大肠杆菌中构建双酶高效表达系统, 实现了全细胞高效催化乳糖合成 D-塔格糖。L-阿拉伯糖异构酶(L-arabinose isomerase, L-AI)是生物合成法中催化半乳糖异构化生成 D-塔格糖的关键酶。本研究首先通过对不同来源的 L-AI 进行筛选, 发现来源于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CGMCC 2921 的 L-AI 具有较好的催化能力。通过对 LfAI 进行理性设计, 获得最优突变体 D390V/V468L, 在最适 40 °C 条件下, 其半衰期延长至 72 h, 酶活提高了 36.68%。随后, 以 pET28a 为载体, 通过启动子优化, 将最优突变体基因(*LfaraA*^{D390V/V468L})和大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶基因(*EclacZ*)在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中串联表达, 建立双酶偶联全细胞体系。最后, 通过优化全细胞催化体系, 在 5 L 发酵罐的最优条件(pH 7.0、温度 50 °C、2.5 mmol/L Mn^{2+})下, 以 500 g/L 乳糖为底物转化 48 h 获得 115.21 g/L D-塔格糖, 转化率为 23.09%。本研究利用重组全细胞催化法以乳糖为底物合成 D-塔格糖, 展现出了显著的工业应用潜力和价值。

关键词: L-阿拉伯糖异构酶; D-塔格糖; 热稳定性; 启动子; 全细胞催化

资助项目: 国家自然科学基金(32471530)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32471530).

#These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2025-01-10; Accepted: 2025-03-20; Published online: 2025-03-21

One-step whole-cell synthesis of D-tagatose from lactose catalyzed by recombinant *Escherichia coli*

LIU Yun^{1,2#}, QIAO Zhina^{1,2#}, ZHANG Hengwei^{1,2}, ZHANG Xian^{1,2}, RAO Zhiming^{1,2*}

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

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: D-tagatose, a functional rare sugar, has garnered increasing attention because of its low calories, blood glucose-lowering, anti-caries, and intestinal flora-improving properties. The existing methods of producing D-tagatose still have problems of low production efficiency and high costs. In this study, we achieved whole-cell catalytic synthesis of D-tagatose from lactose by constructing a dual-enzyme efficient expression system in *Escherichia coli*. L-arabinose isomerase (L-AI) is a key enzyme for the isomerization of galactose to D-tagatose in biosynthesis. In this study, we screened the L-AIs from different sources and found that the L-AI from *Lactobacillus fermentum* CGMCC 2921 had better catalytic ability. The optimal mutant D390V/V468L was obtained by rational design of LfAI. Its half-life was extended to 72 h, and the enzyme activity was increased by 36.68% under the optimum temperature of 40 °C. Then, with pET28a as a vector, the optimal mutant gene (*LfaraA*^{D390V/V468L}) and the β -galactosidase gene from *E. coli* (*EclacZ*) were co-expressed in *E. coli* BL21(DE3) through promoter optimization. Finally, after optimization of the catalytic system, 115.21 g/L D-tagatose was obtained after fermentation under the optimal conditions (pH 7.0, 50 °C, and 2.5 mmol/L Mn²⁺) in a 5 L fermenter with 500 g/L lactose as the substrate for 48 h, with a conversion rate of 23.09%. This study has a good industrial application value in the one-step whole-cell catalytic synthesis of D-tagatose from lactose.

Keywords: L-arabinose isomerase; D-tagatose; thermostability; promoter; whole-cell catalysis

D-塔格糖是一种天然存在的稀有单糖, 与半乳糖是同分异构体, 是 D-山梨醇的 C-3 位差向异构体和 D-果糖的 C-4 位差向异构体。D-塔格糖作为一种稀有糖, 与蔗糖有相近的口感, 甜度约为蔗糖的 92%, 但其热量仅为蔗糖的 1/3^[1-2]。作为一种还原糖, D-塔格糖在高温下易发生焦糖化反应和美拉德褐变反应, 可以应用于烘焙食品中^[3]。2001 年, 塔格糖被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)认定为“公认安全”(generally recognized as safe, GRAS)食品, 并被定义为一种新型甜味剂, 推荐作为食品添加剂使用^[4]。2014 年, 国家卫生健康委员会(原国家卫生和计划生育委员会)将塔格糖批准为安全性食品新原料^[5]。除此以

外, D-塔格糖具有低热量值、零血糖生成指数、血糖钝化作用、无龋齿性、益生元作用和抗氧化活性等优良营养特性^[6]。随着人们健康意识的增强, 塔格糖作为一种新型的低热量甜味剂, 具有广泛的应用市场。如今, 我国许多企业尝试对其进行大规模生产, 但由于酶制剂的开发和生产条件的限制, 普遍存在产量低、反应慢等问题。

自然界的塔格糖可以从热带常青树树胶、苔藓等提取, 但其含量极少且提取成本高^[7-8]。如今常用于塔格糖生产的方法有化学合成法和生物合成法。化学合成法存在反应复杂、对设备损耗大以及对环境不友好的缺点, 而生物合成法在以上这些方面具有一定优势。生物合成法中, 单酶促反应以阿拉伯糖异构酶(L-arabinose

isomerase, L-AI)将半乳糖异构化为塔格糖为主。目前,多种来源的 L-AI 被应用于塔格糖合成的研究。Seo 等^[9]从热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌(*Bacillus thermoglucosidasius*)中提取 L-阿拉伯糖异构酶并在大肠杆菌中进行了表达,发现其纯酶在最佳条件(温度 40 °C、pH 7.0)下可将 36 g/L D-半乳糖催化为 16.42 g/L D-塔格糖。Li 等^[10]将来源于好热黄无氧芽孢杆菌(*Anoxybacillus flavithermus*)的 L-AI 在大肠杆菌中进行异源表达并进行塔格糖合成的研究,结果表明,提高反应温度和添加硼酸盐能够有效促进 D-半乳糖向 D-塔格糖的转化。Guo 等^[11]通过芽孢表面展示技术将短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*) PC16 来源的 L-AI 酶展示在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) DB403 芽孢表面,利用重组芽孢催化 125 g/L 半乳糖, D-塔格糖转化率可以达到 79.7%,此方法具有高效且重复利用性高的优势,但由于芽孢产量较低,限制了其工业化发展。现阶段,对于 L-AI 的研究日益火热,相比之下,使用粗酶或纯酶的催化效率较高,但酶活下降得快。为了更好地适应工业化生产,全细胞生物催化是更好的选择,但仍存在酶的热稳定性差、转化率低以及硼酸添加等问题。

然而,由于以半乳糖为底物的生产成本较高,许多研究采用多酶共表达策略,构建多酶级联反应体系,以实现 D-塔格糖的高效合成。 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase, β -GAL)能够使乳糖的糖苷键断裂,催化其水解和转糖苷^[12]。来源于芽孢杆菌的 β -半乳糖苷酶倾向于催化乳糖的转糖苷,得到低聚半乳糖^[13]。而来源于大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶具有较强的水解活性,更倾向于将乳糖分解成葡萄糖和半乳糖。乳糖经 β -半乳糖苷酶水解成葡萄糖和半乳糖,而半乳糖可被 L-AI 异构化成塔格糖,通过构建双酶表达系统,可以实现从乳糖到塔格糖的一步合成。张留权等^[14]通过共表达来源于 *E. coli* K12 的 β -GAL 和 L-AI,以重悬菌液为粗酶,乳糖为底物,通过条件优化,发现在最优条件(pH 7.0、50 °C)下,

投入 100 g/L 乳糖作为底物, D-塔格糖的转化率可以达到 21%。近些年,对于乳糖一步法合成塔格糖的研究逐渐火热。Zhan 等^[15]构建了共表达 β -半乳糖苷酶和阿拉伯糖异构酶突变体的重组细胞,在 34 °C、pH 6.5、硼酸盐、10 mmol/L Fe^{2+} 和 1 mmol/L Mn^{2+} 的条件下,95%以上的乳糖可以被水解,同时将 43%的 D-半乳糖转化为 D-塔格糖。除此以外,从淀粉和麦芽糊精等出发,也能实现 D-塔格糖的生产。从淀粉出发,通过多酶催化淀粉生成磷酸糖化合物,而后通过差向异构酶等的催化,可以生成 D-塔格糖,反应中涉及多种酶的共同催化^[16-18]。在此基础上, Han 等^[19]通过构建有机硅网络(organosilica network, OSN)人工壳层,将含有反应酶的全细胞进行处理,构建了一种高效稳定的半人工细胞工厂(semiartificial cell factory, SACF),其可连续催化 7 个反应,塔格糖产率超过 40.7%。从淀粉出发生产 D-塔格糖,无疑更具有经济效益,但涉及多种酶的协同反应,在表达调控方面具有挑战性。

启动子是基因表达调控中不可或缺的元素,它是位于结构基因序列起始密码子上游区的一段特定 DNA 区域,主要功能是控制基因表达的起始时间和表达的程度^[20]。近年来,随着生物技术和遗传学的发展,对启动子的研究也取得了显著进展^[21-22]。在大肠杆菌表达系统中,启动子可以分为组成型表达启动子和诱导型表达启动子,常用的诱导型表达启动子如表 1 所示。其中 T7 启动子在调控基因表达中显示出较强的表达强度,其诱导需要添加 IPTG。相比于诱导型启动子,组成型启动子所启动基因的表达具有持续性,但诱导强度不一。本研究采用质粒表达,相比于组成型启动子,诱导型启动子在诱导外源蛋白表达方面表现出更好的优异性。在特定的合成途径中,不同的基因需要进行不同程度的表达,才能达到提高产物产量的目的。然而,针对不同的基因,不同的启动子具有不同的调控强度,因此,选择最适合特定基因的启动子很有必要。

表 1 不同启动子的来源和诱导方法

Table 1 Sources and induction methods of different promoters

Promoter	Source	Induction method
<i>lac</i> UV5	Lactose operon	Lactose/IPTG
Trp	Tryptophan operon	Tryptophan/ 3-indolacrylic acid
T7	T7 RNA polymerase	Lactose/IPTG
T5	T5 phage	Lactose/IPTG
Tac	Trp's -35 zone and <i>lac</i> UV5's -10 zone	Lactose/IPTG
pBAD	Arabinose operon	Arabinose

本课题组^[23]前期构建了塔格糖合成重组大肠杆菌,在 pH 8.0、温度 50 °C、添加 5 mmol/L Mn^{2+} 、0.5 mol/L 硼酸和 0.1% 细胞通透剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)的条件下,全细胞转化 90 h,可催化 500 g/L 底物乳糖生成 83.8 g/L D-塔格糖。塔格糖合成过程存在转化体系加入了非食品级物质硼酸及 SDS 且转化时间较长等问题,因此,本研究在前期研究的基础上,继续挖掘塔格糖合成高效关键酶,同时避免引入非食品级物质,缩短转化时间,以便于更高效、安全地将其应用于 D-塔格糖的大规模生产实践中。本研究通过对不同来源的 L-AI 进行比较和筛选,选择发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CGMCC 2921 来源的 *LfAI* 进行热稳定性改造,与 *E. coli* K12 来源的 β -半乳糖苷酶串联在质粒载体 pET28a 上表达,并通过启动子优化策略,增强酶的表达。在此基础上,对全细胞催化条件进行优化,并在 5 L 发酵罐水平放大生产,以期实现 D-塔格糖的高效合成。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和引物

菌株 *E. coli* K12、*E. coli* BL21(DE3)和质粒载体 pET28a 均由本实验室保存,将编码来源于发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CGMCC 2921 和嗜热脱氮地芽孢杆菌(*Geobacillus*

thermodenitrificans)的 L-AI 的基因 *LfaraA* 和 *GtaraA* 均交由苏州金唯智生物科技有限公司进行人工合成。本研究所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,详见表 2。

1.1.2 培养基

LB 培养基: 5 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 氯化钠。LB 固体培养基在此基础上添加 1.8% 的琼脂粉。

TY 发酵培养基: 8 g/L 安琪酵母, 12 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L 甘油, 4 g/L 磷酸三钾, 3 g/L 氯化钠, 2.5 g/L 硫酸铵, 2.1 g/L 一水合柠檬酸, 0.5 g/L 七水硫酸镁, 0.3 g/L 柠檬酸铁铵; 补料培养基: 400 g/L 甘油, 50 g/L 安琪酵母, 25 g/L 胰蛋白胨。

1.1.3 试剂

限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高保真 DNA 聚合酶、ClonExpress 同源重组克隆试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,小型质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。乳糖和 D-塔格糖均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, D-半乳糖和其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 菌株构建、蛋白表达和检测方法

1.2.1 菌株构建

根据设计的引物,以 *E. coli* K12 基因组为模板,克隆大肠杆菌来源 L-AI 的编码基因 *EcaraA* 和 β -半乳糖苷酶编码基因 *lacZ*; 以合成的发酵乳杆菌来源和嗜热脱氮地芽孢杆菌来源的 L-AI 编码基因为模板,克隆出 *LfaraA* 和 *GtaraA* 基因片段,利用同源重组酶将基因片段分别连接于线性化的 pET28a 质粒(酶切位点分别为 *EcoR* I 和 *Hind* III)上,连接产物转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,构建了重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*、*E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA*、*E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA*。

表 2 DNA 片段扩增引物

Table 2 Primers used for the amplification of DNA fragments

Primer name	Primer sequences (5'→3')
28a-F	AAGCTTGC GGCCGCACTC
28a-R	GAATTCGGATCCGCGACCCA
<i>EcaraA</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGACGATTTTGTATAATTA
<i>EcaraA</i> -R	GAGTGC GGCCGCAAGCTTTTAGCGACGAAACCCGTAAT
<i>GtaraA</i> -F	TGGGTCGCGGATCCGAATTCATGATGCTTTCACCTTAGACC
<i>GtaraA</i> -R	GAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATCTTCCACGCCAGAACA
<i>LfaraA</i> -F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGCGTAAAATGCAGGACTACAAATTCT
<i>LfaraA</i> -R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTTATTTGATGTTGATGAAGTCAACTTTGAACAGAC
<i>lacZ</i> -F	CGCGGATCCGAATTCATGACCATGATTACG
<i>lacZ</i> -R	TGCGGCCGCAAGCTTTTATTTTGTACACCA
<i>LfaraA</i> (<i>lacZ</i>)-R	CCGTAATCATGGTCATGGTATATCTCCTTCTTATTTGATGTTGAT
<i>lacZ</i> (<i>LfaraA</i>)-F	ACATCAAATAAGAAGGAGATATACCATGACCATGATTACGGATTC
<i>lacZ</i> (<i>gfp</i>)-R	TTCTCCCTTACCCATTTTTTGACACCAGACCAACT
<i>gfp</i> -F	GTCTGGTGTCAAAAAATGGGTAAGGGAGAAGAAGT
<i>gfp</i> -R	TGCGGCCGCAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCCA
Mut-F	AGATCTCGATCCCGCGAAATTAANNNNNNTCACTATAGG
Mut-R	TGCGGCCGCAAGCTTTTATTTGTATAGTTC
D390V	GAAGGTAAAGGTTAT <u>GTT</u> ATCACCTGTCTTAC
E364V	GACAAACCGCGTGTT <u>GTG</u> GTTACCCGCTGGGT
D45P	GAAGGTGGTAAACT <u>GCA</u> TACCCGGTTGAATTT
H165R	ATCGCAGACTGGCAG <u>CGT</u> GTTGCGGTAGCGTAC
D227T	TACGACGCGTTCACC <u>ACG</u> AACATCCAGGACCTG
D397G	ACCCTGTCTTACTTC <u>GGT</u> GACGGCTACAAATTC
D187N	GGTGACACCGCACGT <u>AAC</u> GTGGCCGTTACCGAA
H339P	ACCCTGGATCTGCGCCCGGGCCACGAAGCGATC
T93L	AACTGGATCCGTGGT <u>CTA</u> GAACTGCTGCAGAAA
G404I	GGCTACAAATTCATC <u>ATT</u> TACCCGGTTGACTGC
V76I	GACAACGTGGCTGGT <u>ATA</u> ATCACCTGGATGCAC
A229L	GACGAAATCGACGCG <u>CTA</u> TACAAAGACCTGGAA
E158K	GACGCGATGTTCAGAA <u>AA</u> CAGATCGCAGACTGG
N88M	TTCAGCCCGGCGAAA <u>ATG</u> TGGATCCGTGGTACC
V468L	GCGCGTCTGTTCAA <u>ACT</u> AGACTTCATCAACATC
A57P	CTGGTTGCTACCACCCCGGACAGCATCACCAAA
K43N	CTGAACGAAGGTGGT <u>AAT</u> CTGGACTACCCGGTT
A433Y	CCGGAATCGGTCTGT <u>TAC</u> GAAAGGTGCGAAACAG
V48I	AACTGGACTACCCG <u>ATC</u> GAAATTTAACTGGTT
Q164M	CAGATCGCAGACTGG <u>ATG</u> CATGTTGCGGTAGCG

Sequences corresponding to the mutated residues are underlined.

突变菌株的构建：针对不同的突变点设计突变引物，以重组质粒 pET28a-*LfaraA* 为模板进行 PCR 全质粒定点突变，PCR 产物经 *Dpn* I

消化后化转入 *E. coli* BL21，涂布在相应抗性的平板上，挑取转化子进行培养并提取质粒送至苏州金唯智生物科技有限公司测序，验证突变

是否成功。

1.2.2 蛋白表达及纯化

将构建好的菌株进行测序验证后,进行平板活化。将活化后的重组菌株接种于 10 mL LB 液体培养基中,于 37 °C、200 r/min 培养约 12 h。以 1%的接种量接种至 50 mL LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 0.6–1.0,加入终浓度为 0.4 mmol/L 的诱导剂 IPTG,于 25 °C、200 r/min 继续培养约 10–12 h,进行蛋白诱导表达。诱导后的菌体离心收集(8 000 r/min, 5 min)后,用 50 mmol/L、pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液清洗 2 次,最后将菌体悬浮于 5 mL Tris-HCl 缓冲液中。重悬后的菌体用超声细胞破碎仪破碎(工作 1 s,停止 3 s) 15 min 后,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液(即为粗酶液)和沉淀,利用 SDS-PAGE 观察蛋白表达情况。粗酶液用镍离子亲和层析柱进行纯化,得到野生型酶及突变体的纯酶液用于酶学性质研究。

1.2.3 检测方法

L-AI 酶活测定方法:1 mL 的反应体系中含有 100 g/L D-半乳糖、200 μ L 酶液和 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0),加入终浓度为 1 mmol/L Mn^{2+} ,在最适温度下反应 30 min,沸水浴终止反应。之后利用高效液相色谱(HPLC)对反应体系中的各组分含量进行测定。

高效液相色谱检测具体条件为:安捷伦 1260 液相系统,CarboPac Ca^{2+} (6 μ m, 300 mm $\times$ 8.0 mm)色谱柱,超纯水为流动相,流速 0.5 mL/min,进样量 20 μ L,柱温 80 °C,使用示差检测器,检测温度 40 °C。L-AI 酶活定义:每 min 催化生成 1 μ mol D-塔格糖所需的酶量。

1.3 计算机辅助提高 *LfAI* 的热稳定性

前期调研发现,L-AI 在工业转化应用领域面临着转化周期长、酶活性较低和热稳定性较差的难题。基于此,在前期对不同来源的酶进行筛选后,选择催化效率高的酶进行热稳定性改造,以期更适应于工业化的生产。首先,在

PDB 数据库中获得了 *LfAI* (PDB 登录号:4LQL) 的蛋白质结构。然后,利用 FoldX 进行虚拟饱和和突变。FoldX 能够计算点突变的能量变化,通常用于通过比较突变后吉布斯能量($\Delta\Delta G$)的变化来预测蛋白质的热稳定性^[24]。位置特异性打分矩阵(position-specific score matrix, PSSM)基于生物序列的保守性和进化信息,通过序列相似性比对生成,将氨基酸或核苷酸的保守性信息包含在矩阵中,可以反映蛋白质序列上每个氨基酸的进化保守信息^[25]。因此,利用多序列比对和 PSSM 矩阵,排除相对保守的位点。最后,采用分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟方法,通过计算蛋白质在溶剂中的原子运动,在原子水平上表征体系的微观演化,直观地观察实验的机理和原理。在 MD 模拟结果的基础上,利用均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)值进一步细化残基,以表明氨基酸位点的灵活可变性^[26]。综合考虑以上方法所给出的结果,选择合适的可行突变位点。

1.4 启动子优化提高酶表达水平

双酶级联反应是一种重要的生化反应技术,它利用 2 种不同的酶协同工作来完成特定的生化过程。经文献调研及前期测试发现^[22],大肠杆菌来源的 β -半乳糖苷酶的水解率可以达到约 99%,制约着一步法催化乳糖生成塔格糖的关键酶为阿拉伯糖异构酶。通过蛋白质工程提高 L-AI 酶活后,选择 *LfaraA* 的最优突变体,用 SD (Shine-Dalgarno)序列将其与 *lacZ* 进行串联表达,构建重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ*。在双酶表达系统中,不同基因的表达程度极大地影响着全细胞催化的效率,因此,本研究尝试对原有启动子进行突变,以期更好地调控关键酶的表达。在原核启动子中,-35 区和-10 区的碱基序列具有高度的保守性,它们之间的间隔区域中碱基的种类和数量对启动子的活性起重要作用,如果发生改变会影响其控制的基因表达的强度^[27]。T7 启动子是大肠杆菌中调控能力较强的启动子,对其

进行改造并不一定能获得预期的效果,但 Nie 等^[28]为了提高头孢菌素 C 酰化酶(cephalosporin C acylase, CCA)在大肠杆菌中的表达量,对 T7 启动子的序列进行突变和筛选后得到的最强启动子可使 CCA 的表达量提高 1.3 倍,这为研究提供了很好的思路。基于此原理,本研究通过对 T7 启动子间隔区域的非保守序列进行随机突变,构建了启动子文库。

以质粒 pET28a-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ* 为模板进行质粒线性化,将绿色荧光蛋白 GFP 基因片段融合于基因 *lacZ* 之后,通过同源重组连接化转于感受态细胞之中,构建菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ-gfp*。确认菌株能够表达相关蛋白之后,提取质粒 pET28a-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ-gfp*,使用引物 Mut-F (在启动子中含有突变的序列)和 Mut-R 进行 PCR,获得含随机突变序列的 DNA 片段,再与经 *Bgl* II 和 *Eag* I 线性化的质粒进行连接,转化至感受态 *E. coli* BL21。复苏后,涂布于含有微量 IPTG 的 LB 固体平板上,置于 37 °C 培养箱中过夜培养。挑取具有荧光的单菌落于 96 孔板中,在 37 °C 条件下培养 2 h 后,加入 0.4 mmol/L IPTG 在 25 °C 下培养约 16 h,使用酶标仪进行荧光强度的检测。

1.5 全细胞催化条件的优化

经前期启动子优化后,将构建的重组菌株作为全细胞催化剂,用于优化一步法催化乳糖生成塔格糖的条件。首先,探究不同底物乳糖浓度对 D-塔格糖生产的影响。转化体系为 10 mL,菌体 $OD_{600}=60$, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 5 mmol/L Mn^{2+} , 加入不同浓度的乳糖(100–600 g/L),置于 40 °C 反应 48 h。反应结束后,取样品煮沸以终止酶反应,稀释后用高效液相色谱(HPLC)检测体系中各种糖的含量。采用同样的方法,通过控制单变量,对菌体 OD、pH、温度、金属离子浓度和转化时间等条件进行优化。

1.6 5 L 发酵罐的扩大培养及转化

重组菌株划线活化后,挑取单菌落接种于

10 mL LB 液体培养基(含 50 µg/mL 卡那霉素)中过夜培养后,按 2.5%接种量转接于 120 mL LB 中扩大培养约 7 h。使用 TY 培养基,在 5 L 发酵罐对重组菌株进行培养,接种后,控制温度 37 °C、pH 7.0、初始转速 300 r/min。当菌体 OD 达到 2 左右时,采用间隔升转速的方式,每隔 0.5 h 提升 50 r/min 直至 600 r/min。同时监测菌体 OD_{600} , OD_{600} 为 7–9 时,开始匀速流加补料培养基; OD_{600} 为 15–20 时,将培养温度降低为 25 °C,加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导。约 12 h 后,监测菌体 OD,当体系中菌体 OD 稳定后,停止发酵,离心收集菌体。将离心收集的菌体作为全细胞催化剂,在 5 L 发酵罐中进行最适条件下的扩大转化。

2 结果与分析

2.1 菌株构建及不同来源的 L-AI 比较筛选

以 *E. coli* K-12 基因组为模板,扩增出 *EcaraA* (1 503 bp)和 *lacZ* (3 075 bp)基因,同时以合成的 *GtaraA* (1 494 bp)和 *LfaraA* (1 425 bp)为模板,分别扩增相关基因,将基因片段分别连接到表达载体 pET28a 上,导入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,构建菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*lacZ*、*E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA*、*E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA*。对菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA*、*E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA* 进行培养、诱导表达和细胞破碎,对破碎后的上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 1 所示,在 45–60 kDa 之间处均出现明显的条带,与 L-AI 的理论分子量吻合。

初步探索 3 种不同来源的 L-AI 在不同温度、金属离子和 pH 下的相对酶活,以期筛选出转化能力较强的 L-AI。在所测定的温度范围内,*LfAI* 在 40 °C 下具有最高的酶活,且在 50 °C 以上酶活下降明显。然而,*EcAI* 和 *GtAI* 均在 50 °C 下显示出最高的酶活,随着温度的升高,

酶活也下降明显(图 2A)。大多数 L-AI 在偏碱性的条件下显示出更好的催化能力, 由图 2B 可知, *EcAI* 和 *GtAI* 与文献报道一致, 均在 pH 9.0 下具有最高酶活, 但 *LfAI* 在适中的 pH 7.0 时具有最高的酶活, 对转化条件的要求相对没那么严苛。参考相关文献中^[29-30]提到的可以提高 L-AI 活性的金属离子, 选择了 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 和 Mg^{2+} 进行测试比较, 结果发现, 3 种来源的 L-AI 均在添加 Mn^{2+} 的情况下具有最高的酶活(图 2C)。基于此, 对 3 株菌株同时进行培养及诱导, 采用全细胞进行转化能力测试。全细胞测试体系均为 10 mL, 以 100 g/L 半乳糖为底物, 添加

同等浓度的 Mn^{2+} , 分别在各自最适 pH 和温度下进行 48 h 的转化。结果如图 2D 所示, 来源于发酵乳杆菌的 L-AI 表现出更好的转化能力, 可以产生 46.21 g/L D-塔格糖, 转化率为 43.97%, 转化条件相对温和。相比之下, 来源于大肠杆菌和嗜热脱氮地芽孢杆菌的 L-AI 转化率分别为 41.21% 和 19.35%, 且转化体系 pH 均为 9.0。除此以外, 塔格糖在过碱的条件下容易发生焦糖化和美拉德反应, 不利于后续产物的分离提取, 另外考虑到工业化生产条件的简便性, 最终选择来源于发酵乳杆菌的 L-AI 进行后续研究。

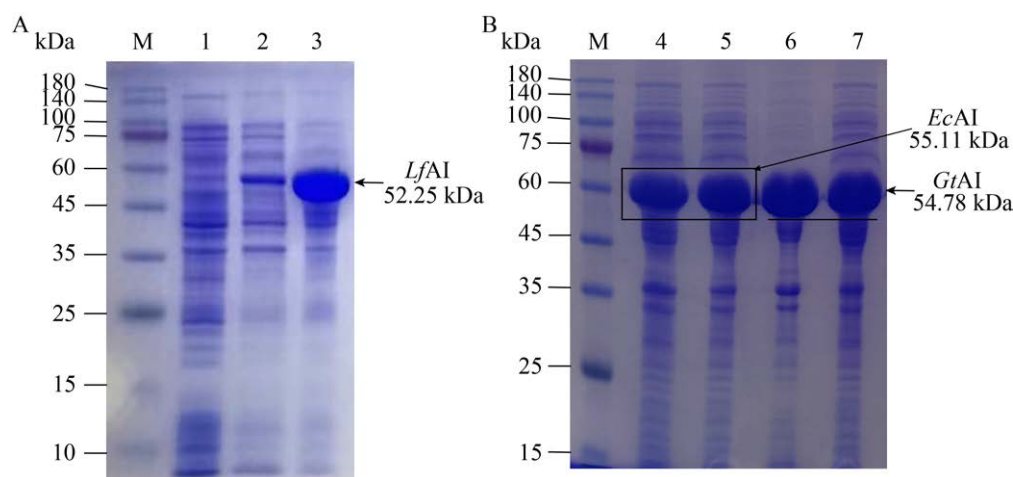


图 1 SDS-PAGE 分析不同来源的 L-AI 蛋白的表达 A: 发酵乳杆菌来源 L-AI (*LfAI*)蛋白表达 SDS-PAGE 分析。泳道 M: 蛋白 marker; 泳道 1: *E. coli* BL21/pET28a 粗酶液; 泳道 2: *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* 细胞破碎沉淀; 泳道 3: *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* 细胞破碎上清。B: 大肠杆菌(*EcAI*)和嗜热脱氮地芽孢杆菌(*GtAI*)来源 L-AI 蛋白表达 SDS-PAGE 分析。泳道 M: 蛋白 marker; 泳道 4: *E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA* 细胞破碎上清; 泳道 5: *E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA* 细胞破碎沉淀; 泳道 6: *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA* 细胞破碎上清; 泳道 7: *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA* 细胞破碎沉淀。

Figure 1 SDS-PAGE analysis of L-AI protein expression from different sources. A: SDS-PAGE analysis of L-AI protein expression from *Lactobacillus fermentum* (*LfAI*). Lane M: Protein marker; Lane 1: *E. coli* BL21/pET28a crude enzyme solution; Lane 2: *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* cell fragmentation precipitation; Lane 3: *E. coli* BL21/pET28a-*LfaraA* cell crushing supernatant. B: SDS-PAGE analysis of L-AI protein expression from *Escherichia coli* (*EcAI*) and *Geobacillus thermodenitrificans* (*GtAI*). Lane M: Protein marker; Lane 4: *E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA* cell crushing supernatant; Lane 5: *E. coli* BL21/pET28a-*EcaraA* cell fragmentation precipitation; Lane 6: *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA* cell crushing supernatant; Lane 7: *E. coli* BL21/pET28a-*GtaraA* cell breakdown precipitation.

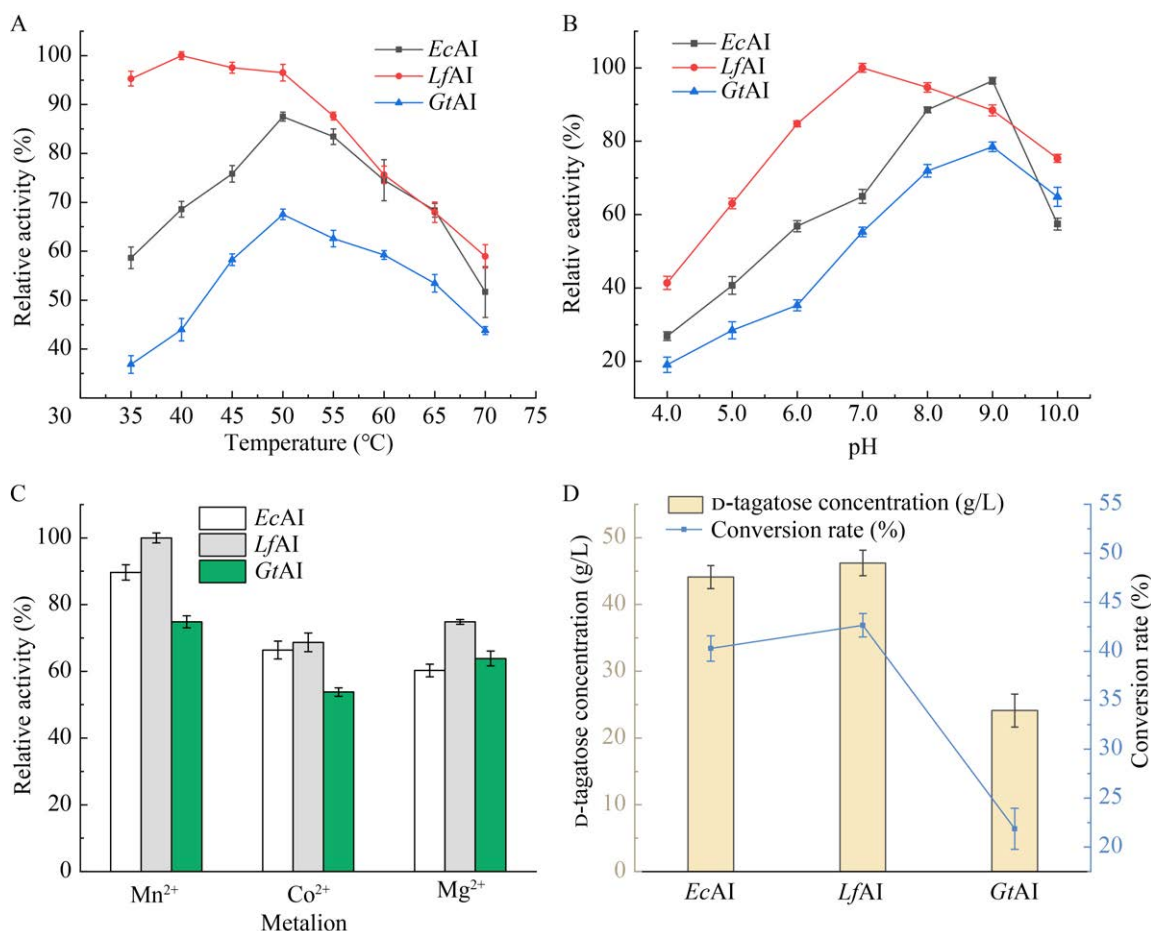


图2 大肠杆菌(*EcAI*)、发酵乳杆菌(*LfAI*)和嗜热脱氮地芽孢杆菌(*GtAI*)来源的 L-阿拉伯糖异构酶的酶学性质和转化能力 A: 最适温度的测定; B: 最适 pH 的测定; C: 最适金属离子的测定; D: 不同来源的 L-阿拉伯糖异构酶在各自最佳条件下的转化能力和 D-塔格糖浓度。

Figure 2 Enzymatic properties and transformation ability of the L-arabinose isomerase from *Escherichia coli* (*EcAI*), *Lactobacillus fermentum* (*LfAI*) and *Geobacillus thermodenitrificans* (*GtAI*). A: The optimal temperature; B: The optimal pH; C: The optimal metal ion species; D: The conversion capacity and D-tagatose concentration of L-arabinose isomerase from different sources under their respective optimum conditions.

2.2 *LfAI* 的热稳定性及酶活的提高

目前, 对于 *LfAI* 的研究主要集中于对底物 D-半乳糖的转化率上, 这是酶分子改造的主要途径。若将其运用于工业化生产中, 酶的活性固然需要保持在较高水平, 但与此同时, 其热稳定性也不容忽视。对不同来源的 L-AI 进行测试发现, 当温度高于其最适温度时, 酶活性显著降低。然而, L-AI 催化 D-半乳糖生成 D-塔格糖是一个可逆的异构化反应, 较高的温度容易使平衡向产物

转移^[31]。因此, 对 *LfAI* 进行热稳定性改造势在必行。首先对不同来源的 L-AI (图 3A)进行多序列比对, 不同来源的 L-AI 在许多位点上有相同的氨基酸, 推测这些是相对保守的位点^[32]。同时, 参考已经被解析的 *EcAI* 蛋白结构, 推测 *LfAI* 的活性位点和金属离子结合位点。本研究首先通过 PSSM 矩阵评分对发酵乳杆菌来源的 *LfAI* 进行初步筛选(图 3B)。之后, 通过计算能量变化, 使用 FoldX 预测 *LfAI* 的虚拟饱和突变位点(图 3C)。

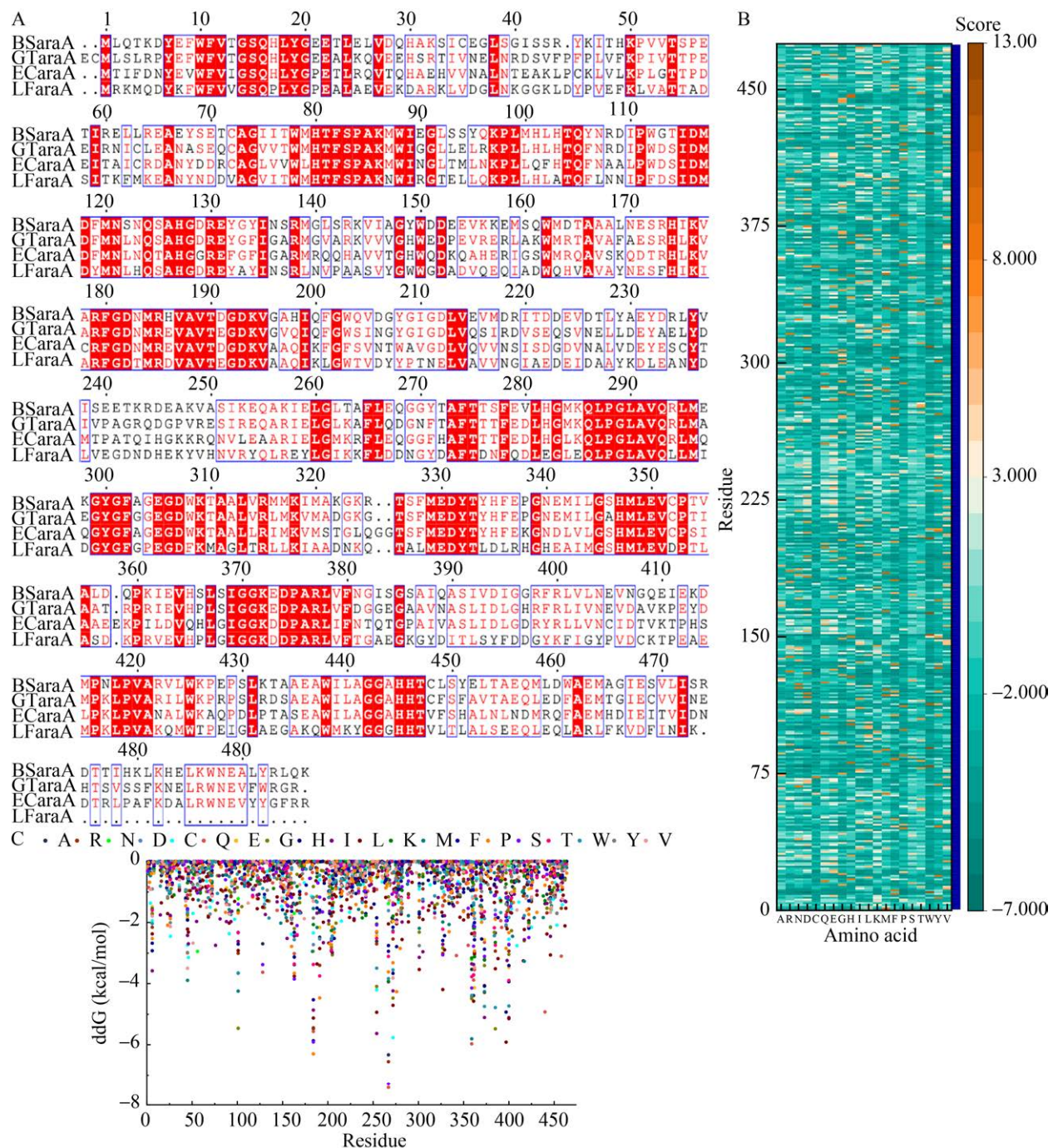


图3 计算机辅助设计选择突变点 A: 不同来源的 L-AI 的多氨基酸序列比对。来源包括枯草芽孢杆菌、嗜热脱氮地芽孢杆菌、大肠杆菌和发酵乳杆菌。B: 基于 PSSM 评分的可允许残基突变。越保守的氨基酸在这个位置得分越高。C: *LfaraA* 虚饱和突变的 $\Delta\Delta G$ 值。彩色圆圈表示虚拟突变后的能量变化, $\Delta\Delta G$ 为正的部分不显示。

Figure 3 Computer aided design selection of mutation points. A: Multiple amino acid sequence alignment of *araA* from various organisms. The alignment includes *araA* from *Bacillus subtilis*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Escherichia coli* and *Lactobacillus fermentum*. B: Evolvable residues based on the PSSM score to allow mutations. The more conserved amino acids scored higher at this position. C: The $\Delta\Delta G$ value of the virtual saturation mutation of *LfaraA*. The colored circles represent the energy change after virtual mutation, and the part where $\Delta\Delta G$ is positive is not shown.

通过序列比对和 PSSM 矩阵预测, 排除 *LfAI* 的保守位点。随后, 结合 FoldX 的能量变化预测结果, 初步选择 20 个突变位点(D390V、E364V、D45P、H165R、D277T、D397G、D187N、H339P、T93L、G404I、V76I、A229L、E158K、N88M、V468L、A57P、K43N、A433Y、V48I、Q164M)进行检测。酶活性测定结果表明, 与野生型相比, D390V、D187N、H339P、V468L、V76I 和 V48I 分别提高了 31.72%、22.58%、30.28%、30.16%、28.67%和 12.78% (图 4A)。之后, 对酶活性提高的突变体进行热稳定性测试。常用于描述蛋白质热稳定性的参数有熔解温度(T_m)和半衰期($t_{1/2}$)。半衰期($t_{1/2}$)是指在特定温度下, 酶或其他生物分子保持其原始活性一半所需的时间长度, 代表了酶的动力学稳定性^[33]。本研究以最适温度下的半衰期来表示其稳定性。结果表明, 野生型 *LfAI* 的酶活性在 48 h 左右为初始酶活性的 50%, 突变体 D390V 和 V76I 在 72 h 时仍保持了原始酶活性的 50%, D390V 在前 48 h 仍能保持初始酶活性的 80%以上, 突变体 H339P 和 V468L 在 54 h 左右酶活性开始下降至原始酶活性的 50%, 而突变体 D187N 和 V48I 在不到 48 h 的时间内将酶活性降低到初始酶活性的 50%以下(图 4B)。

综合考虑酶活和热稳定性, 构建了 6 个双突变体, 分别记为 M1 (D390V/H339P)、M2 (D390V/V468L)、M3 (D390V/V76I)、M4 (H339P/V468L)、M5 (H339P/V76I)和 M6 (V468L/V76I)。酶活测定结果显示, M1、M2 和 M3 均显示出比单突变体更高的酶活(图 4C), 分别提高了 40.65%、36.68%、21.94%。对显示出更高酶活的双突变体进行热稳定性测试, 发现 M1 和 M2 的热稳定性优异性明显, 且在前 48 h 内具有较高的酶活性(图 4D)。随后, 对 M1 和 M2 同时进行不同温度下酶活测定以及最适温度下的全细胞转化能力测试。结果显示, 在全细胞催化时, M2 在相同转化时间内对底物的催化效率要优于 M1, 且其在更高温度下的相对酶活高于 M1 (图

4E、4F)。经综合考虑, 将 M2 用于后续研究。

根据吉布斯自由能, 在封闭系统中, 能量值(ddG)越低, 物质的稳定性越高^[34]。根据 FoldX 的预测结果, D390V 和 V468L 的 ddG 分别降至-4.78 和-1.28 (图 5A、5B), 而其 ddG 下降主要都是由于突变后疏水作用的增加。疏水相互作用的增加可以降低蛋白质在高温下解折叠的速率, 在稳定蛋白质三级结构中起着关键作用^[35]。同时, 采用分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟方法, 分析 *LfAI* 和突变体的 RMSF 和 RMSD 来反映分子结构的稳定性(图 5C、5D)。相较于 *LfAI*, D390V 和 V468L 的 RMSF 值总体上呈现出较高的趋势。与 D-半乳糖结合的邻近位点的残基包括 I370、F279、M185、V188、E306、H447、E331、H348 和 M349, 附近是蛋白质中高度不规则和灵活的环结构^[36]。D390V 和 V468L 在该区域 RMSF 值显著增加(图 5C), 且双突变体在该区域 RMSF 值高于单突变体, 显示出更好的灵活性。因此, 与野生型 *LfAI* 相比, 突变体的蛋白结合区域的柔韧性增加, 更有利于蛋白结合袋内残基与底物的相互作用, 从而提高了反应的催化效率。

2.3 针对双酶表达系统的启动子文库的构建及筛选

构建针对于双酶表达系统的启动子文库, 通过随机突变, 在抗性平板中挑取带有绿色荧光的单菌落于 96 孔板中培养, 并添加 IPTG 进行诱导, 以原始菌株作为空白对照, 统一检测相对荧光强度。经检测, 在挑取的 47 株菌株中, 其相对荧光强度跨度明显, 但大部分突变并未显示出更好的效果, 仅有 6 株菌株在初次筛选中表现出相对于原始启动子更强的荧光强度(图 6A)。之后对原始菌株和初筛后的 6 个菌株进行再次培养和诱导, 3 次平行实验后, 有 3 株菌株(44、47 和 48)均表现出比原始菌株更高的相对荧光强度(图 6B)。提取质粒, 通过测序获得突变后的启动子序列, 分别命名为 P1、P2 和 P3 (表 3)。在众多突变方法中, 随机突变的

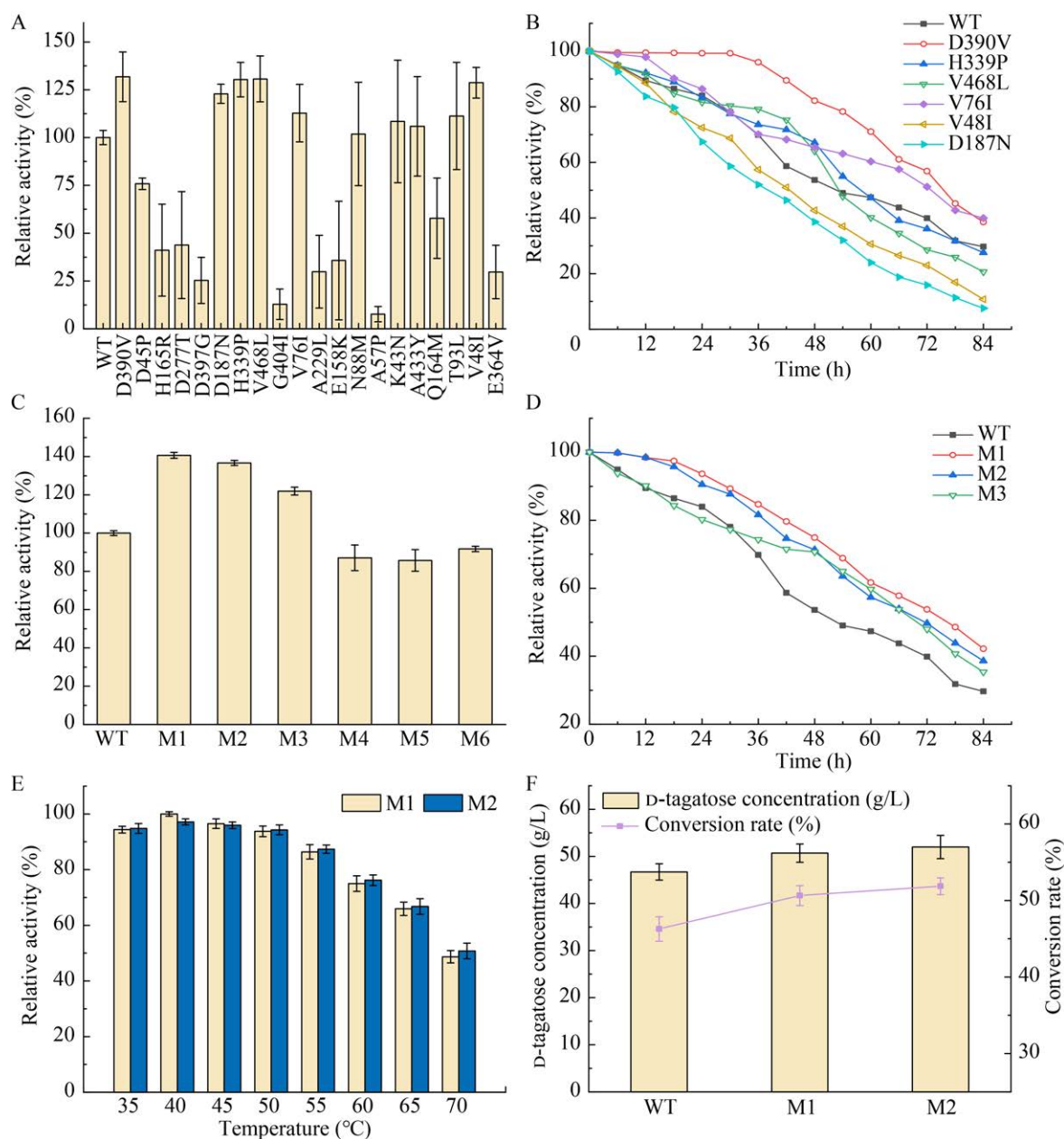


图 4 野生型酶和突变体的酶活和热稳定性分析 A: 野生型及其单点突变体的相对酶活性; B: 野生型及其单点突变体在不同时间的相对酶活性, 以半衰期表示其热稳定性; C: 野生型及双点突变体的相对酶活性; D: 野生型及双点突变体在不同时间的相对酶活性, 以半衰期表示其热稳定性; E: 双突变体 M1 和 M2 在不同温度下的相对酶活性; F: 野生型酶、双突变体 M1 和 M2 在相同条件下全细胞转化生成的 D-塔格糖含量和转化率对比。

Figure 4 Analysis of enzyme activity and thermostability of wild-type enzymes and mutants. A: Relative enzyme activity of the wild-type and its single-point mutants; B: Relative enzyme activity of wild type and its single-point mutants at different time, indicating thermostability; C: Relative enzyme activity of the wild-type and its double-point mutants; D: Relative enzyme activity of wild type and its double-point mutants at different time, indicating enzyme activity stability; E: Relative enzyme activities of double mutants M1 and M2 at different temperatures; F: Comparison of D-tagatose concentration and conversion rate of wild-type enzyme, double mutant M1 and M2 in whole cell transformation under the same conditions.

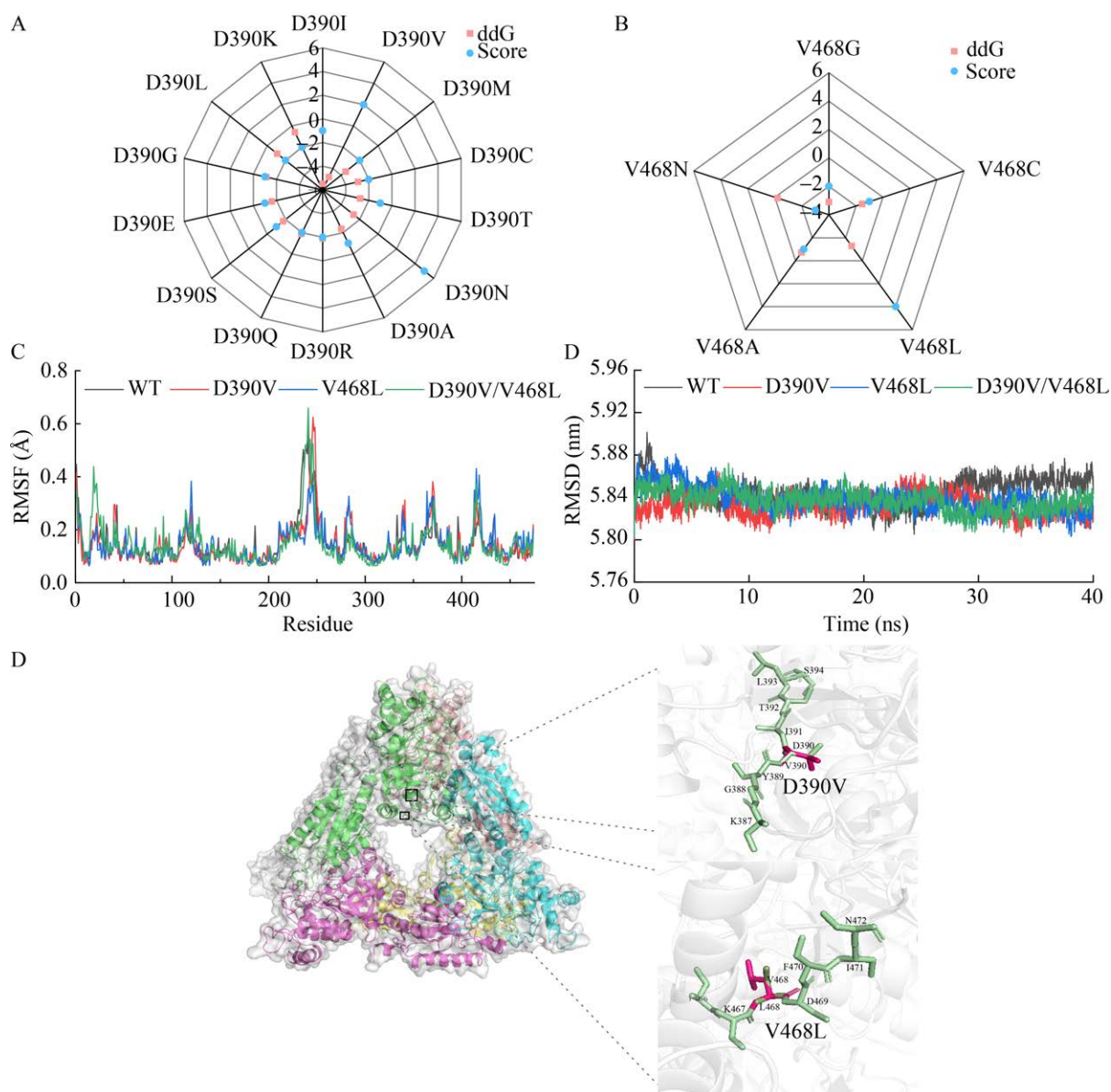


图5 野生型和突变体 M2 的分子动力学分析 A: D390 位点虚拟饱和和突变后得到的 ddG 能量变化(去掉正部分)及相应的 PSSM 评分。B: V468 位点虚拟饱和和突变后得到的 ddG 能量变化(去掉正部分)及相应的 PSSM 评分。C: WT、D390V、V468L 和 D390V/V468L 体系侧链原子的 RMSF 值。其中黑、红、蓝、绿线分别代表 WT、D390V、V468L 和 D390V/V468L 系统的结果。D: WT、D390V、V468L 和 D390V/V468L 体系侧链原子的 RMSD 值。其中黑、红、蓝、绿线分别代表 WT、D390V、V468L 和 D390V/V468L 系统的结果。E: *LfAI* 的蛋白质结构及其突变位点。该蛋白质具有 6 条侧链, 不同的颜色代表不同的链。突变前的 D390 和 V468 采用绿色表示, 突变后的 V390 和 L468 采用红色表示。图像采用 PyMOL 生成。

Figure 5 Molecular dynamics analysis of wild type and mutant M2. A: The energy change (ddG) obtained after virtual saturation mutation at site D390 (with the positive part discarded) and the corresponding PSSM score. B: The energy change (ddG) obtained after virtual saturation mutation at site V468 (with the positive part discarded) and the corresponding PSSM score. C: RMSF values of the side-chain atoms for the WT, D390V, V468L and D390V/V468L systems. D: RMSD values of the side-chain atoms for the WT, D390V, V468L and D390V/V468L systems. E: The protein structure of *LfAI* and its mutation sites. The protein has 6 side chains, different colors represent different chains. The mutant sites D390 and V468 are shown in green, and the mutant sites V390 and L468 are shown in red. The image was generated using PyMOL.

D390, V468L and D390V/V468L systems. The black, red, blue and green lines represent the results of the WT, D390, V468L and D390V/V468L systems, respectively. D: RMSD values of the side-chain atoms for the WT, D390, V468L and D390V/V468L systems. The black, red, blue and green lines represent the results of the WT, D390, V468L and D390V/V468L systems, respectively. E: The protein structure and mutation sites of *LfAl*. The protein has 6 side chains, with different colors representing different chains. D390 and V468 are shown in green before the mutation, and V390 and L468 are shown in red after the mutation. Images were generated with PyMOL.

成本相对较低, 适合大规模的突变筛选, 但与此同时, 其具有盲目性和随机性, 较难得到预期的结果, 且重复性较差。本研究通过随机突变获得的启动子 P1、P2 和 P3 具有可重复性, 可用于下一步研究。

而后, 将含有启动子 P1、P2 和 P3 的双基因菌株分别命名为 SP1、SP2 和 SP3, 与原始 T7 启动子调控的菌株进行同时的培养和诱导。将诱导后的菌株控制相同菌体生物量, 洗涤重悬后用作全细胞催化剂, 以 200 g/L 乳糖为底物在 40 °C 条件下进行全细胞转化测试, 结果显示, P3 启动子调控的菌株具有最高的转化率, 是原始菌株的 1.13 倍(图 6C)。本研究获得的启动子 P3 在调控中展示出其提高双基因表达的能力, 为下一步研究提供了参考。

2.4 全细胞催化条件的优化

通过对启动子的优化和关键酶的改造, 构建菌株 *E. coli* BL21/pET28a-P3-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ* 作为全细胞催化剂。为了高效生产 D-塔格糖, 对重组菌株的全细胞转化条件进行了优化, 包括底物浓度、温度、pH、金属离子浓度、转化时间和细胞生物量(OD_{600})。

底物浓度是影响全细胞催化的重要因素。当乳糖浓度为 500 g/L 时, 转化率最高可达到 19.18%, 合成了(95.94±1.43) g/L D-塔格糖(图 7A)。当底物浓度过高时, 由于转化体系中的糖分较大, 流动性较差, 影响物质进出细胞。在 2.5 mmol/L Mn^{2+} 的辅助下, 转化率最高达到 20.12% (图 7B)。根据前面的测试, 酶活性受转化体系 pH 的影响。在所测定的 pH 范围内, 当 pH 控制在 7.0 时, 300 g/L 乳糖可以生成

(62.74±1.12) g/L D-塔格糖, 此时达到最高的转化率, 为 20.69% (图 7C)。反应温度对 D-塔格糖的合成有明显的影 响, 在 50 °C 时 D-塔格糖含量为(65.99±1.28) g/L, 转化率为 20.96%, 明显高于 40 °C 下 17.98% 的转化率(图 7D)。在之前的实验中, 突变酶转化的最适温度为 40 °C, 低于全细胞催化的最适温度。原因可能是在高温条件下细胞膜的通透性更好, 更有利于物质的进出。细胞生物量是影响转化率的关键因素, 当菌体 OD_{600} 达到 100 时, 转化率最高, 达到 21.39%, 此时可以生成(66.23±1.37) g/L D-塔格糖(图 7E)。其原因可能是当菌体生物量低时, 体系中含酶量较少, 而当细胞浓度过高时, 细胞流动性差, 影响底物的进入, 导致转化率低。

扩大摇瓶转化体系至 50 mL, 控制转化条件为: 500 g/L 乳糖、pH 7.0、2.5 mmol/L Mn^{2+} 、50 °C、 OD_{600} =100。在不同时间间隔取样, 测定体系中各成分的含量。在前 6 h 内, 乳糖几乎完全水解, 水解率可达约 98%。在约 18 h 时, D-塔格糖的转化率可达到 20%。在 18–48 h 内, D-塔格糖含量在不断提高, 在 48 h 时, 转化率约为 22.13% (图 7F)。之后继续转化, 发现体系中各成分含量变化不大。这一现象可归因于在持续高于酶的最适温度的条件下, 酶的活性出现下降, 虽仍有转化能力, 但速率明显降低。因此, 综合考虑时间和成本, 在 48 h 时停止反应。通过在摇瓶中进行不同体系的转化实验, 在最适条件下转化 48 h, 可以生成约 (111.26±1.85) g/L 的 D-塔格糖, 转化率为 22.25%。

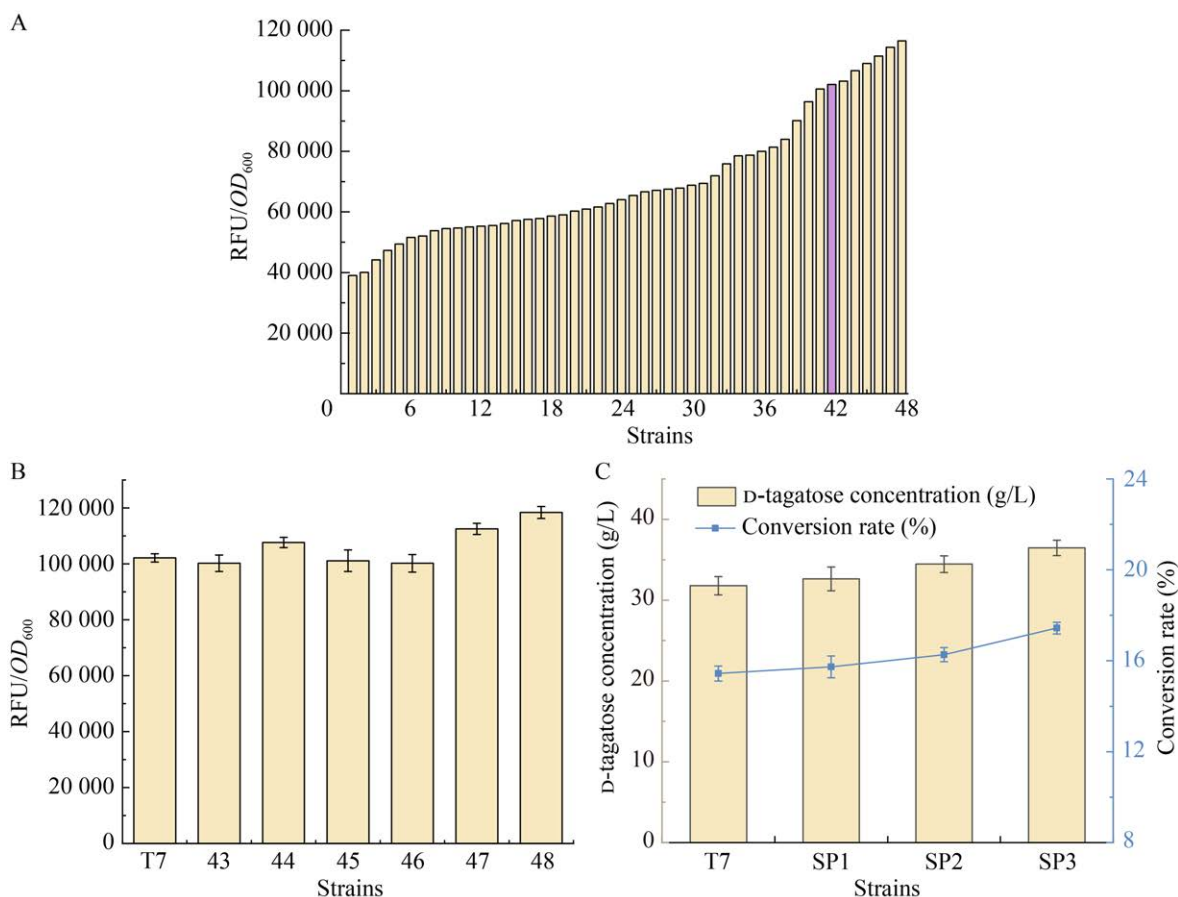


图 6 启动子文库的构建和筛选 A: 启动子文库的初筛。将含有随机启动子序列的菌株和原始菌株在 96 孔板上培养, 用酶标仪检测其荧光强度和菌体生物量(OD_{600})。紫色框线表示原始启动子序列的原始对照。B: 启动子文库的复筛。其中 T7 表示含有原始启动子的菌株, 菌株 43–48 为初筛时相对荧光强度优于原始启动子的菌株。C: 含有不同启动子的菌株全细胞转化的 D-塔格糖含量和转化率对比。其中 T7 为原始启动子调控的菌株, SP1、SP2 和 SP3 分别为复筛中对应的启动子 P1、P2 和 P3 调控的菌株。

Figure 6 Construction and screening of promoter library. A: Preliminary screening of promoter libraries. The strains containing random promoter sequences and the original strains were cultured on 96-well plates, and their fluorescence intensity and microbial biomass (OD_{600}) were detected by microplate reader. The purple box line represents the original reference to the original promoter sequence. B: Rescreening of promoter library. Among them, T7 represents the strain containing the original promoter, and strains 43–48 are the strains whose relative fluorescence intensity is superior to that of the original promoter in the initial screening. C: Comparison of D-tagatose concentration and conversion rate in whole cell transformation of strains containing different promoters. Among them, T7 represents the strain regulated by the original promoter, and SP1, SP2 and SP3 were the strains regulated by the corresponding promoters P1, P2 and P3 in the rescreening, respectively.

表 3 不同启动子的序列和相对强度

Table 3 Sequence and relative strength of different promoters

Promoters	Sequences (5'→3')	Relative strength
T7	TAATACGACTCACTATAG	–
P1	TAATACGTCTCACTATAG	1.054
P2	TAATCAGACTCACTATAG	1.101
P3	TAATAAGTCTCACTATAG	1.159

2.5 5 L 发酵罐的放大转化

为了更好地契合工业化生产的需求, 在 5 L 发酵罐中对重组大肠杆菌生产 D-塔格糖的转化系统进行了放大测试。按照前述方法, 采用 5 L 发酵罐对重组菌株进行培养。18 h 时, OD_{600} 为 84.3, 继续监测, 0.5 h 后为 84.6, 几乎稳定, 最后离心收集细胞进行全细胞转化。

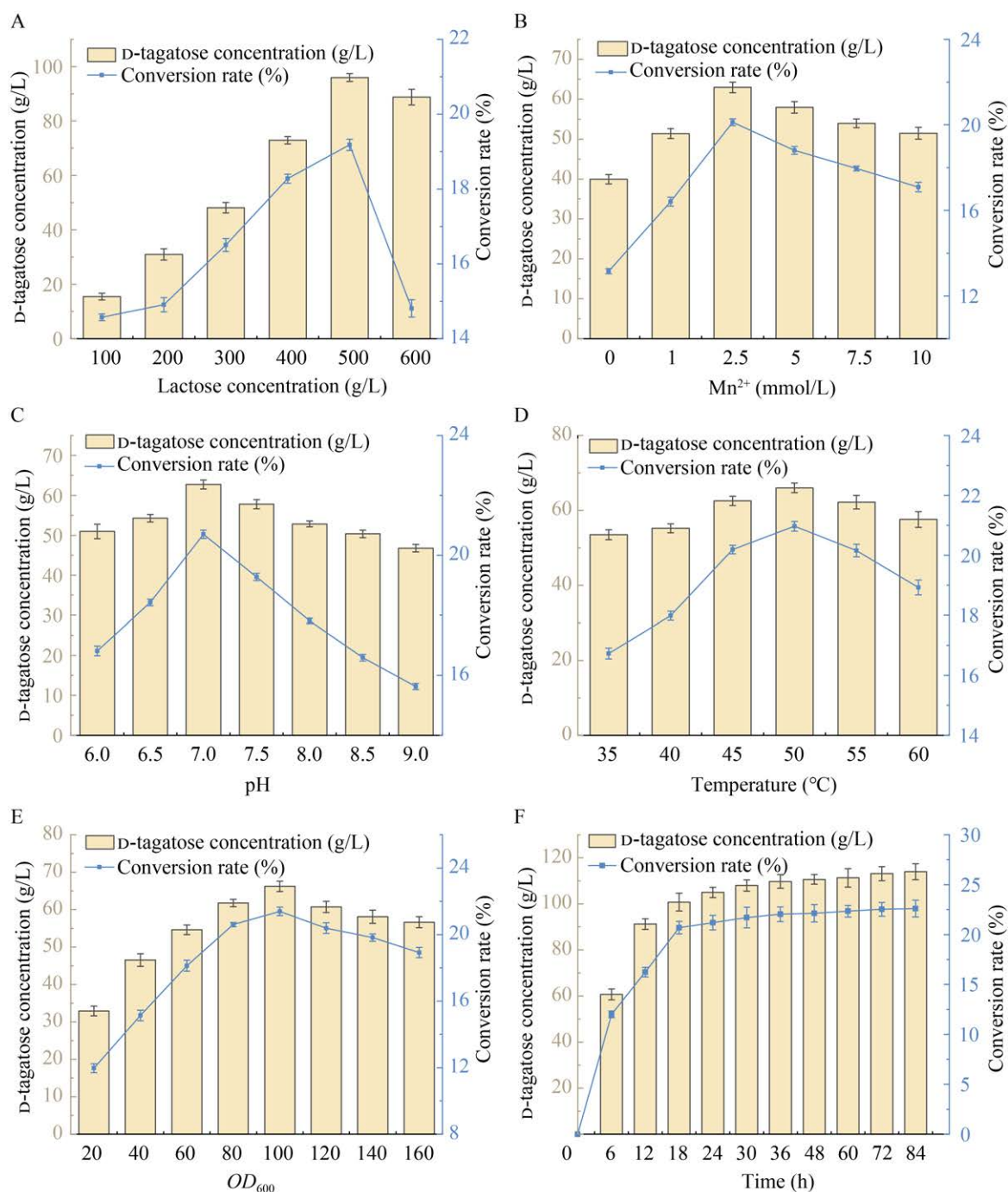


图 7 重组菌株全细胞转化条件的优化 A: 最优底物乳糖浓度; B: 转化液的最优 pH 值; C: 最优 Mn^{2+} 添加量; D: 最优转化温度; E: 最优菌体生物量(OD_{600}); F: 不同转化时间下 D-塔格糖的生成量和转化体系的转化率。

Figure 7 Optimization of whole cell transformation conditions of recombinant strains. A: The optimal substrate lactose concentration; B: The optimal pH for conversion; C: The optimal Mn^{2+} concentration; D: The optimal conversion temperature; E: The optimal microbial biomass (OD_{600}); F: The concentration of D-tagatose and conversion rate of transformation system at different conversion times.

控制 5 L 发酵罐的转化条件为：500 g/L 乳糖、 $OD_{600}=100$ 、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0)、2.5 mmol/L Mn^{2+} 、50 °C。与摇瓶转化相比，重组菌株在 5 L 发酵罐中表现出更好的催化性能。在前 6 h，底物乳糖的水解率达到 99.00%，葡萄糖的产量为 247.85 g/L。在 6–18 h 内，D-半乳糖被异构化生成 D-塔格糖的速率增加，乳糖生成 D-塔格糖的转化率达到 20.00% 左右，D-塔格糖产量为 (100.76 ± 2.12) g/L (图 8)。18 h 后，D-塔格糖的生成速度逐渐减慢，可能是由于体系中酶活性的降低。转化 48 h，体系中乳糖、葡萄糖和 D-半乳糖的浓度分别为 6.21 g/L、248.32 g/L 和 129.26 g/L，D-塔格糖的产量为 (115.21 ± 2.78) g/L，转化率为 23.09%。本研究为 D-塔格糖的工业化生产奠定了良好基础，有望进一步扩大生产规模。

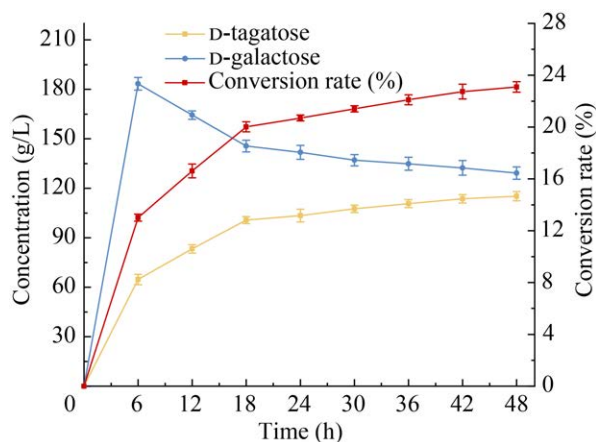


图 8 重组菌株在 5 L 发酵罐中的转化放大
Figure 8 Transformation amplification of recombinant strains in a 5 L fermenter. The conversion rate is calculated by the formula $\omega=C/C_0$, where C represents the concentration of D-tagatose and C_0 represents the concentration of all sugar substances in the system.

3 讨论与结论

如今，不同微生物来源的 L-AI 被广泛挖掘和应用用于 D-塔格糖的生产中，然而，其工业化生产进程却受到多重因素的制约，如酶活性低、

稳定性差和转化条件过于严苛等。本研究首先结合课题组之前的研究^[23]以及相关的文献^[36-37]报道，通过对不同来源的 L-AI 进行对比，发现来源于发酵乳杆菌的 *LfAI* 具有较好的转化能力及条件适应性。之后，为更好适应工业化应用，针对其热稳定性进行改造。相比于野生 *LfAI*，其最优突变体 D390V/V468L 能够将酶活提高 36.68%，且 40 °C 下的半衰期延长至 72 h，具有实际应用价值。

考虑到半乳糖作为底物价格昂贵，通过引入 β -半乳糖苷酶将较为廉价的乳糖水解获取半乳糖。将来源于大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶基因与突变后的 *LfaraA*^{D390V/V468L} 进行串联表达后，尝试通过启动子优化提高蛋白表达量，构建重组大肠杆菌。将构建的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pET28a-P3-*LfaraA*^{D390V/V468L}-*lacZ* 作为全细胞催化剂，探究影响乳糖合成 D-塔格糖的多种因素，确定其最适条件为：以 500 g/L 乳糖为底物，投加 $OD_{600}=100$ 的菌体和 2.5 mmol/L Mn^{2+} ，在 pH 7.0 的 Tris-HCl 缓冲液中，50 °C 反应 48 h。将转化体系放大，在 5 L 发酵罐中进行转化，重组菌株可获得 (115.21 ± 2.78) g/L D-塔格糖，转化率可达 23.09%。李娟等^[36]对 *LfAI* 进行改造后直接采用粗酶进行转化，反应 60 h 时转化率可达 22.80%，相比之下，全细胞在操作简便的情况下其转化率也有所提高。Zhang 等^[38]利用重组菌株静息细胞产 D-塔格糖，在最佳条件 (65 °C, pH 7.5) 下，175 g/L 的乳糖在 56 h 时转化 D-塔格糖的转化率达到 33.00%。提高温度有利于提高转化率，但也会影响后续的分选纯化。表 4 比较了不同来源的 L-阿拉伯糖异构酶在不同表达宿主中以乳糖为底物合成 D-塔格糖方面的进展，相比之下，本研究在转化条件和时间等方面均更符合工业化生产的需求。

之前的研究发现，由于硼酸结构的独特性，可以与塔格糖形成硼酸-塔格糖复合物，从而促进转化向合成塔格糖的方向移动^[37]，但硼酸的添加阻碍了塔格糖在食品中的应用。本研究通

表 4 不同生物法生产 D-塔格糖的方法比较

Table 4 Comparison of different biological methods for D-tagatose production

Source of L-AI	Expression host	Lactose concentration (g/L)	Reaction condition	Time (h)	Conversion rate (%)	Reference
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Escherichia coli</i>	140	50 °C, pH 6.5, 5 mmol/L Mn ²⁺	96	36.70	[1]
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	500	50 °C, pH 8.0, 5 mmol/L Mn ²⁺ , 0.5 mol/L borate, 0.1% SDS	96	16.76	[23]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	400	55 °C, pH 6.0, 1.4 mg/mL enzyme, 1 mmol/L Mn ²⁺ , 1 mmol/L Co ²⁺	60	22.80	[36]
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	175	65 °C, pH 7.5	56	33.00	[38]
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	500	50 °C, pH 8.0, 3 mmol/L Mn ²⁺ , 0.1% Triton X-100	90	19.36	[39]
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Escherichia coli</i>	500	50 °C, pH 7.0, 2.5 mmol/L Mn ²⁺	48	23.09	This study

过关键酶挖掘与理性改造、双酶表达元件优化以及全细胞转化条件优化,实现了在不添加硼酸的情况下高效合成塔格糖。目前,固定化酶的研究备受关注,实现了在循环利用的同时具有操作的稳定性。Hong 等^[40]将表达新阿波罗栖热袍菌(*Thermotoga neapolitana*) L-AI 的大肠杆菌细胞固定在海藻酸钙微球中,在 70 °C 连续循环模式下,得到的细胞反应器在 12 h 内分别从 180 g/L 和 90 g/L D-半乳糖中产生 49 g/L 和 38 g/L D-塔格糖,为固定化酶提供了思路。在本研究中,关键酶的热稳定性已经有所提升,但在单次转化过程中并未有很好的体现,下一步研究将尝试将重组全细胞进行固定化和重复操作,检测其酶活,以期进一步提高转化效率。

作者贡献声明

刘芸: 方案设计、实验操作、数据管理、初稿写作; 乔郅钠: 方案设计、稿件润色修改; 张恒维: 方案设计、软件设计; 张显: 提供材料、监督指导; 饶志明: 监督指导、提供材料、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

[1] ZHANG GY, ZABED 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*[J]. Bioresource Technology, 2020, 305: 123010.

[2] DAI YW, LI ML, JIANG B, ZHANG T, CHEN JJ. Whole-cell biosynthesis of D-tagatose from maltodextrin by engineered *Escherichia coli* with multi-enzyme co-expression system[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 145: 109747.

[3] O'CHAROEN S, HAYAKAWA S, MATSUMOTO Y, OGAWA M. Effect of D-psicose used as sucrose replacer on the characteristics of meringue[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(12): E2463-E2469.

[4] 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[J]. Nature Communications, 2019, 10(1): 1356.

[5] 李子杰, 沈立群, 费康清, 陈洲, 中西秀树. D-塔格糖的生理活性及生物合成研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(6): 20-28.

LI ZJ, SHEN LQ, FEI KQ, ZHONGXI XS. Research progress on physiological activity and biosynthesis of D-tagatose[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(6): 20-28 (in Chinese).

[6] ORTIZ AC, FIDELES SOM, REIS CHB, PAGANI BT, BUENO LMM, MOSCATEL MBM, BUCHAIM RL, BUCHAIM DV. D-tagatose: a rare sugar with functional properties and antimicrobial potential against oral species[J]. Nutrients, 2024, 16(12): 1943.

[7] LIU Y, LI S, XU H, WU LT, XU Z, LIU J, FENG XH. Efficient production of D-tagatose using a food-grade surface display system[J]. Journal of Agricultural and

- Food Chemistry, 2014, 62(28): 6756-6762.
- [8] 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[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(3): 829-835.
 - [9] SEO MJ. Characterization of an L-arabinose isomerase from *Bacillus thermoglucosidasius* for D-tagatose production[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2013, 77(2): 385-388.
 - [10] LI YJ, ZHU YM, LIU AJ, SUN YX. Identification and characterization of a novel L-arabinose isomerase from *Anoxybacillus flavithermus* useful in D-tagatose production[J]. Extremophiles, 2011, 15(3): 441-450.
 - [11] GUO Q, AN YF, YUN JH, YANG MM, MAGOCHA TA, ZHU JF, XUE YB, QI YL, HOSSAIN Z, SUN WJ, QI XH. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 940-946.
 - [12] ZHAO L, ZHOU YZ, QIN S, QIN PP, CHU JL, HE BF. β -galactosidase BMG without galactose and glucose inhibition: secretory expression in *Bacillus subtilis* and for synthesis of oligosaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 274-278.
 - [13] 王建宇, 李婷, 李敬, 江正强, 闫巧娟. 芽孢杆菌 35 家族 β -半乳糖苷酶的性质及其在合成低聚半乳糖中的应用[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(6): 29-38.
WANG JY, LI T, LI J, JIANG ZQ, YAN QJ. Characterization of GH family 35 β -galactosidase from bacillales sp. and its application in synthesis of galactooligosaccharides[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(6): 29-38 (in Chinese).
 - [14] 张留权, 王玥, 丁庆豹, 欧伶, 许彦梅, 张春艳, 魏晓琨. 联合 β -半乳糖苷酶和 L-阿拉伯糖异构酶法合成 D-塔格糖的研究[J]. 工业微生物, 2012, 42(4): 48-53.
ZHANG LQ, WANG Y, DING QB, OU L, XU YM, ZHANG CY, WEI XK. Enzymatic synthesis of D-tagatose from lactose with the combination of β -galactosidase and L-arabinose isomerase[J]. Industrial Microbiology, 2012, 42(4): 48-53 (in Chinese).
 - [15] 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[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(11): 2412-2417.
 - [16] WICHELECKI DJ. Enzymatic synthesis of D-tagatose: US20180216146[P]. 2018-08-02.
 - [17] 石婷, 宋展, 宋世怡, 张以恒. 体外生物转化(ivBT): 生物制造的新前沿[J]. 合成生物学, 2024, 5(6): 1437-1460.
SHI T, SONG Z, SONG SY, ZHANG YH. *In vitro* BioTransformation (ivBT): a new frontier of industrial biomanufacturing[J]. Synthetic Biology Journal, 2024, 5(6): 1437-1460 (in Chinese).
 - [18] ZHANG YH, EVANS BR, MIELENZ JR, HOPKINS RC, ADAMS MWW. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway[J]. PLoS One, 2007, 2(5): e456.
 - [19] 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.
 - [20] KANHERE A, BANSAL M. Structural properties of promoters: similarities and differences between prokaryotes and eukaryotes[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(10): 3165-3175.
 - [21] 于慧敏, 郑煜堃, 杜岩, 王苗苗, 梁有向. 合成生物学研究中的微生物启动子工程策略[J]. 合成生物学, 2021, 2(4): 598-611.
YU HM, ZHENG YK, DU Y, WANG MM, LIANG YX. Microbial promoter engineering strategies in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2021, 2(4): 598-611 (in Chinese).
 - [22] 余君涵, 马雯雯, 王智文, 陈涛, 赵学明. 人工合成启动子文库研究进展[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 198-204.
YU JH, MA WW, WANG ZW, CHEN T, ZHAO XM. Progress in synthetic promoter library[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 198-204 (in Chinese).
 - [23] 李志月, 张显, 饶志明, 张荣珍. 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[J]. 微生物学报, 2021, 61(9): 2907-2920.
LI ZY, ZHANG X, RAO ZM, ZHANG RZ. One-step synthesis of lactose to tagatose by co-expressing β -galactosidase and arabinose isomerase[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(9): 2907-2920 (in Chinese).
 - [24] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, NYS R, ROUSSEAU F, SERRANO L. The FoldX web server: an online force field[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(Web Server issue): W382-W388.
 - [25] 邹向辉, 冯永娥. 基于氨基酸理化特征识别疾病相关的蛋白质与金属离子配体的结合位点[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2024, 45(2): 78-85.
ZOU XH, FENG YE. Identification of binding sites of protein associated with diseases and metal ion ligands based on physicochemical characteristics of amino acids[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2024, 45(2): 78-85 (in Chinese).
 - [26] SUN ZT, LIU Q, QU G, FENG Y, REETZ MT. Utility of B-factors in protein science: interpreting rigidity, flexibility, and internal motion and engineering thermostability[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(3): 1626-1665.
 - [27] 许莹, 唐丽娟, 张部昌, 刘静. 启动子改造优化策略在微生物代谢工程中的应用[J]. 生命科学, 2022, 34(7): 871-879.
XU Y, TANG LJ, ZHANG BC, LIU J. Application of promoter optimization strategies in microbial metabolic engineering[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2022, 34(7): 871-879 (in Chinese).
 - [28] NIE ZH, LUO H, LI JF, SUN HX, XIAO Y, JIA RQ, LIU TJ, CHANG YH, YU HM, SHEN ZY. High-throughput screening of T7 promoter mutants for soluble expression of cephalosporin C acylase in *E. coli*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 190(1): 293-304.
 - [29] MEN Y, ZHU YM, ZHANG LL, KANG ZK, IZUMORI K, SUN YX, MA YH. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning,

- overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5[J]. Microbiological Research, 2014, 169(2/3): 171-178.
- [30] SALONEN N, NYSSÖLÄ A, SALONEN K, TURUNEN O. *Bifidobacterium longum* L-arabinose isomerase: overexpression in *Lactococcus lactis*, purification, and characterization[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168(2): 392-405.
- [31] FAN C, XU W, ZHANG T, ZHOU L, JIANG B, MU WM. Engineering of *Alicyclobacillus hesperidum* L-arabinose isomerase for improved catalytic activity and reduced pH optimum using random and site-directed mutagenesis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(7): 1480-1492.
- [32] KATO K, ROZEWICKI J, YAMADA KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(4): 1160-1166.
- [33] BAN XF, LIU YT, ZHANG YZ, GU ZB, LI CM, CHENG L, HONG Y, DHOBLE AS, LI ZF. Thermostabilization of a thermophilic 1,4- α -glucan branching enzyme through C-terminal truncation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107: 1510-1518.
- [34] BUß O, RUDAT J, OCHSENREITHER K. FoldX as protein engineering tool: better than random based approaches[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2018, 16: 25-33.
- [35] GROMIHA MM, PATHAK MC, SARABOJI K, ORTLUND EA, GAUCHER EA. Hydrophobic environment is a key factor for the stability of thermophilic proteins[J]. Proteins, 2013, 81(4): 715-721.
- [36] 李娟, 吴敬, 陈晟, 夏伟. 发酵乳杆菌来源 L-阿拉伯糖异构酶理性设计及在 D-塔格糖生产中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1107-1118.
- LI J, WU J, CHEN S, XIA W. Rational design of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* and its application in D-tagatose production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1107-1118 (in Chinese).
- [37] LIM BC, KIM HJ, OH DK. High production of D-tagatose by the addition of boric acid[J]. Biotechnology Progress, 2007, 23(4): 824-828.
- [38] 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.
- [39] ZHANG X, LU RQ, WANG Q, HU MK, LI ZY, XU MJ, YANG TW, ZHANG RZ, RAO ZM. Production of D-tagatose by whole-cell conversion of recombinant *Bacillus subtilis* in the absence of antibiotics[J]. Biology (Basel), 2021, 10(12): 1343.
- [40] HONG YH, LEE DW, LEE SJ, CHOE EA, KIM SB, LEE YH, CHEIGH CI, PYUN YR. Production of D-tagatose at high temperatures using immobilized *Escherichia coli* cells expressing L-arabinose isomerase from *Thermotoga neapolitana*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 569-574.