

D-阿洛酮糖 3-差向异构酶重组枯草芽孢杆菌构建及固定化应用

魏玉霞, 张显, 胡孟凯, 邵宇, 潘珊, 藤田盛久, 饶志明

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

魏玉霞, 张显, 胡孟凯, 等. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶重组枯草芽孢杆菌构建及固定化应用. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4303-4313.

Wei YX, Zhang X, Hu MK, et al. Construction and immobilization of recombinant *Bacillus subtilis* with D-allulose 3-epimerase. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4303-4313.

摘要: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (D-allulose-3-epimerase) 是异构化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖 (D-allulose) 的关键酶。为提高 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的热稳定性并获得可重复使用的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶重组枯草芽孢杆菌固定化细胞, N 端融合双亲短肽, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析, 异源 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中正确折叠, 蛋白大小为 33 kDa。40 °C 孵育 48 h, SAP1-DSDPEase 残余酶活仍保持在 58%。固定化细胞最优条件为海藻酸钠浓度 2%、二氧化钛添加量 1:4 (二氧化钛:海藻酸钠)、氯化钙溶液浓度 2%、戊二醛 0.02% 作为交联剂。该条件下固定化细胞酶活回收率高达 82%, 固定化细胞与游离细胞相比, 最适反应温度不变均为 80 °C, 热稳定性提高, 连续 10 次操作使用, 酶活回收率仍保留 58%, 机械强度仍保持 100%, 转化率仍保持在 28.8%, 残余酶活保持在 70.5%。在海藻酸钠溶液中加入二氧化钛可减少固定化细胞的细胞泄露, 增大了机械强度。

关键词: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶, 双亲短肽, 枯草芽孢杆菌, 二氧化钛, 固定化细胞

Construction and immobilization of recombinant *Bacillus subtilis* with D-allulose 3-epimerase

Yuxia Wei, Xian Zhang, Mengkai Hu, Yu Shao, Shan Pan, Morihisa Fujita, and Zhiming Rao

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

Abstract: D-allulose-3-epimerase (DPEase) is the key enzyme for isomerization of D-fructose to D-allulose. In order to

Received: January 3, 2021; **Accepted:** March 16, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFA0908300), National Natural Science Foundation of China (No. 32071470), Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region, China (No. 2020BFH02011), Key Research and Development Project of Shandong Province, China (No. 2019JZZY020605), Foundation of Fujian Key Laboratory of Functional Aquaculture and Culture Environment Control, China (No. FACE20200003).

Corresponding authors: Morihisa Fujita. Tel: +86-510-85197071; E-mail: fujita@jiangnan.edu.cn
Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2020YFA0908300), 国家自然科学基金 (No. 32071470), 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2020BFH02011), 山东省重点研发项目 (No. 2019JZZY020605), 福建省水产功能性饲料及养殖环境调控重点实验室开放课题 (No. FACE20200003) 资助。

improve its thermal stability, short amphiphilic peptides (SAP) were fused to the N-terminal of DPEase. SDS-PAGE analysis showed that the heterologously expressed DPEase folded correctly in *Bacillus subtilis*, and the protein size was 33 kDa. After incubation at 40 °C for 48 h, the residual enzyme activity of SAP1-DSDPEase was 58%. To make the recombinant *B. subtilis* strain reusable, cells were immobilized with a composite carrier of sodium alginate (SA) and titanium dioxide (TiO₂). The results showed that 2% SA, 2% CaCl₂, 0.03% glutaraldehyde solution and a ratio of TiO₂ to SA of 1:4 were optimal for immobilization. Under these conditions, up to 82% of the activity of immobilized cells could be retained. Compared with free cells, the optimal reaction temperature of immobilized cells remained unchanged at 80 °C but the thermal stability improved. After 10 consecutive cycles, the mechanical strength remained unchanged, while 58% of the enzyme activity could be retained, with a conversion rate of 28.8% achieved. This study demonstrated a simple approach for using SAPs to improve the thermal stability of recombinant enzymes. Moreover, addition of TiO₂ into SA during immobilization was demonstrated to increase the mechanical strength and reduce cell leakage.

Keywords: D-allulose-3-epimerase, short amphiphilic peptides, *Bacillus subtilis*, titanium dioxide, immobilized cells

D-阿洛酮糖是 D-果糖 C-3 差向异构体, 属于稀有糖的一种, 它具有蔗糖 70% 的甜度, 但热量很低, 只有蔗糖的 0.3%^[1]。2014 年, 美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 正式批准 D-阿洛酮糖为一般公认安全 (Generally recognized as safe, GRAS), 允许其应用于食品、膳食补充剂以及医药制剂中^[2]。D-阿洛酮糖具有多种保健作用, 可抗高血糖症、预防或治疗肥胖及因肥胖引起的炎症、调节胆固醇代谢和调节肠道微生物群发挥其生物学效应。D-阿洛酮糖天然存在于一些水果中, 含量极低^[3], 化学方法合成 D-阿洛酮糖步骤烦琐且效率低, 经济便捷的生物法合成 D-阿洛酮糖成为研究热点。日本香川大学 Izumori 团队利用 1 株产碱菌首次实现生物法合成 D-阿洛酮糖, 并通过固定化酶异构化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖^[4-5]。近十年来, 已有 15 种以上的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶被报道, 转化率均在 20%–35%, 反应条件偏碱性, 其中半衰期最久的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶来源于解纤维梭状芽胞杆菌 *Clostridium cellulolyticum* H10, 该酶在 60 °C 半衰期为 6.8 h^[6]。酶分子 N 端融合双亲短肽是提高热稳定性的有效方法, 例如, 通过短肽形成的氢键作用提高固定化酶的热稳定性^[7]。D-阿洛酮糖为胞内酶, 获得纯酶需浓缩、破细胞和纯化等步骤, 工业生产选择全细胞催化较为经济

快捷。全细胞生物催化, 要求宿主细胞是不分泌内毒素、外毒素和异味物质的 GRAS 菌株, 枯草芽孢杆菌作为革兰氏阳性菌的模式生物, 是宿主细胞的最佳选择^[8]。

游离的全细胞在催化反应结束后, 收集困难并且在重复使用的过程中会造成细胞破损。为了解决游离细胞的生产弊端, 固定化细胞技术应运而生, 1973 年, 日本的千畑一郎首次在工业上使用固定化微生物细胞, 成功利用固定化大肠杆菌连续生产 L-天冬氨酸^[9]。固定化细胞制备方法包括吸附法、包埋法、共价法和交联法 4 种, 固定化材料要求无生物毒性, 性质稳定, 廉价耐用。固定化载体有无机载体 (硅藻土、多孔玻璃、金属氧化物)、有机载体 (天然多糖、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇)、复合载体 (金属有机框架 MOF、海藻酸钠-石墨烯、海藻酸钠-二氧化硅), 其中复合载体具有两种固定方法共同作用, 例如共价-交联法、吸附-包埋法^[10]。孙帆等通过硅藻土-海藻酸钠 (吸附-包埋法) 固定 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (D-allulose-3-epimerase, DPEase) 重组枯草芽孢杆菌, 固定化细胞酶活回收率为 64%, 连续 7 个转化批次残余酶活保留 81%^[11]。李秋喜等通过海藻酸钠包埋和戊二醛交联固定化 DPEase 重组大肠杆菌酶活回收率为 76%, 重复使用 8 次后残余酶活保持 61%^[12]。

本研究通过融合双亲短肽 (SAPs) 提高了

1.2.3 蛋白表达分析

收集细胞后, 洗涤 3 次, 并浓缩至 OD_{600} 为 60, 加入终浓度 1 mg/mL 的溶菌酶, 置于冰上酶解 6 h 后进行超声破碎。离心后, 取上清液, 通过 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况。

1.2.4 酶活测定

酶液酶活测定: 取 100 μ L 酶液加入到 900 μ L 底物溶液 (100 g/L D-果糖, 140 μ mol/L Co^{2+} , 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) 中, 在 60 $^{\circ}C$ 、1 000 r/min 振荡金属浴中反应 2 min, 沸水煮 5 min, 终止酶催化反应。固定化细胞酶活测定: 称取 0.5 g 固定化细胞, 加入 1 mL 反应溶液 (100 g/L D-果糖, 140 μ mol/L Co^{2+} , 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5), 在 60 $^{\circ}C$ 、1 000 r/min 振荡金属浴中反应 2 min, 使用移液枪取上清液, 置于沸水中煮 5 min, 终止反应。

酶活单位定义: 在 pH 8.5 Tris-HCl 缓冲液中, 振荡金属浴 60 $^{\circ}C$ 、1 000 r/min 条件下, 1 min 生成 1 μ mol D-阿洛酮糖作为一个酶活单位。

酶活回收率: 固定化细胞的酶活回收率是指固定化细胞的总活力与用于固定化的全细胞总活力的百分率。

酶活回收率 (%) = (固定化酶总活力) / (用于固定化的总酶活力) \times 100

相对活性 (%) = 相同反应条件固定化细胞活性 / 相同反应条件固定化细胞最大活性 \times 100

分析方法: 反应溶液稀释相应倍数过 0.22 μ m 纤维滤膜, 使用安捷伦 1260 高效液相色谱 RID 检测器分析, 分析条件为液相色谱柱 HI-Plex Ca, 300.0 mm \times 7.7 mm, 柱温 80 $^{\circ}C$, 流动相超纯水, 流速 0.4 mL/min, 单个样品运行时间 40 min, 检测器温度 55 $^{\circ}C$ 。

1.2.5 热稳定性测定

将 DSDPEase、SAP1-DSDPEase、SAP2-DSDPEase、SAP3-DSDPEase、SAP4-DSDPEase 纯酶置于 40 $^{\circ}C$ 水浴锅中孵育 48 h, 每隔 6 h 取

出 100 μ L, 按照 1.2.4 酶活测定方法检测残余酶活。

1.2.6 重组枯草芽孢杆菌固定化

称取适量海藻酸钠, 加入 10 mL 去离子水, 加热搅拌至海藻酸钠全部融化, 加入适量比例的二氧化钛, 超声处理 5 min, 使各组分分散均匀, 置于冰上冷却 20 min, 加入 5 mL 菌液, 搅拌均匀。使用带有针头的 10 mL 注射器吸取混合液, 在 10 cm 高处以 1 滴/s 的速度滴入 $CaCl_2$ 溶液中, 随即形成大小均一的光滑小球, 0–4 $^{\circ}C$ 静置硬化一段时间。硬化结束, 将固定化小球悬浮于 0.03% 的戊二醛溶液中交联, 然后使用生理盐水洗涤 3 次, 真空抽滤, 吸取固定化小球表面水分, 置于 4 $^{\circ}C$ 备用。

1.2.7 固定化细胞条件优化

采用单因素试验对海藻酸钠浓度、二氧化钛比例、 $CaCl_2$ 浓度、戊二醛浓度和细胞包埋量等固定化条件进行优化。海藻酸钠浓度 2%, 二氧化钛: 海藻酸钠 1: 2, $CaCl_2$ 浓度 1%, 戊二醛浓度 0.01%, 控制其中 3 个因素不变, 单因素作为变量来考察每个因素对固定化细胞相对酶活回收率和机械强度的影响。

1.2.8 固定化细胞和游离细胞的最适反应温度和 pH

配制不同 pH 的缓冲液, pH 3.0–6.0 $C_6H_8O_7-Na_3C_6H_5O_7$ 缓冲液, pH 6.0–8.0 $NaH_2PO_4-Na_2HPO_4$ 缓冲液, pH 8.0–9.0 Tris-HCl 缓冲液, 称取等量固定化小球, 在不同 pH 缓冲液中按照 1.2.4 酶活测定方法, 确定固定化细胞和游离细胞最适反应 pH。在相同 pH 条件下, 设置不同的反应温度, 按照 1.2.4 酶活测定方法, 确定固定化细胞和游离细胞的最适反应温度。

1.2.9 固定化细胞和游离细胞 pH 和温度稳定性

将固定化小球分别在不同温度水浴锅中孵育 10 h, 取出按照 1.2.5 测定相对残余活性, 测定固定化小球的温度稳定性。将固定化小球和游离细

胞在不同 pH 缓冲液中冰浴 5 h, 取出用生理盐水洗涤 3 次, 按照 1.2.4 方法测定固定化细胞 pH 稳定性。

1.2.10 固定化细胞操作稳定性

在最优化条件下制作固定化细胞小球, 并称取适量于 250 mL 三角瓶中, 加入 40 mL 500 g/L D-果糖溶液, 反应温度参考 1.2.9 中的温度稳定性以延长固定化细胞小球的使用寿命, 转速设置为 200 r/min, 反应 1.5 h, 计算不同批次的固定化细胞的酶活收率和机械强度。每次反应结束, 生理盐水洗涤固定化细胞小球 3 次, 重复操作, 连续转化 10 次, 分别计算每一批次的残余活性。探究了海藻酸钠-戊二醛 (包埋-交联法) 和二氧化钛-海藻酸钠-戊二醛 (包埋-吸附-交联法) 固定化细胞的操作稳定性。按照同样方法测定二氧化钛-海藻酸钠-戊二醛法固定化细胞不同使用批次的残余酶活与生成 D-阿洛酮糖的转化率。

1.2.11 机械强度测定

将一定量细胞置于 50 mL 三角瓶中, 加入 10 mL 生理盐水, 使用磁力搅拌器在 50 °C、200 r/min 条件下搅拌 8 h, 计数完整的固定化细胞小球。

机械强度 (%) = 完整的固定化细胞小球数 / 初始固定化细胞小球数 × 100^[14]

2 结果与分析

2.1 多雷亚菌 DSDPEase 的克隆与表达

从 NCBI 数据库检索到多雷亚菌 *Dorea* sp. CAG317 的 DPEase 基因序列, 人工合成 DSDPEase 基因片段, 并以此为模板分别 PCR 得到相应碱基大小的基因片段 (图 1)。按照方法 1.2.1 构建重组菌株, 超声破碎细胞, 对胞内蛋白进行 SDS-PAGE 分析 (图 2), DSDPEase 粗酶液、SAP1-DSDPEase、SAP2-DSDPEase、SAP3-DSDPEase 目的蛋白大小均为 33 kDa, 蛋白凝胶在 29 kDa 附近出现较明显的蛋白质特征条带。

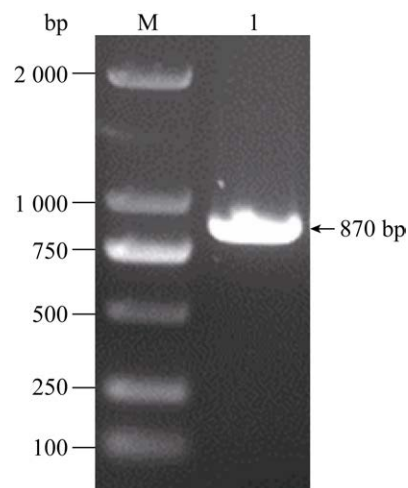


图 1 DPEase 基因克隆

Fig. 1 DPEase gene cloning. Lane 1: DSDPEase.

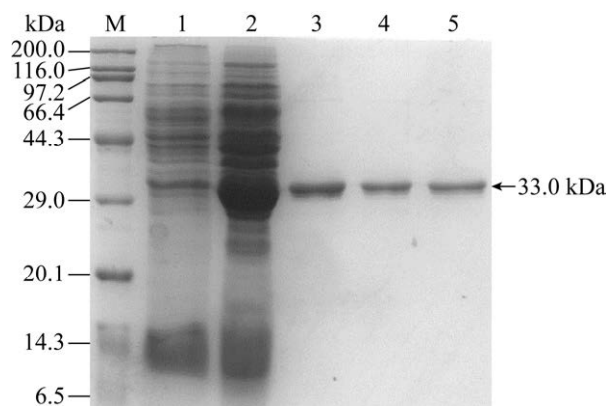


图 2 SAPs-DSDPEase SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of SAPs-DSDPEase. Lane 1: control; lane 2: *B. subtilis*/pMA5-DSDPEase cell free supernatant; lane 3: SAP1-DSDPEase pure enzyme; lane 4: SAP2-DSDPEase pure enzyme; lane 5: SAP3-DSDPEase pure enzyme.

2.2 融合双亲短肽对 DSDPEase 热稳定性的影响

为比较 SAPs 对 DSDPEase 热稳定性的影响, 按照方法 1.2.4 测定不同时间的残余酶活, 结果如图 3, SAP1-DSDPEase 残余酶活高于对照组 DSDPEase 与 SAP2-DSDPEase、SAP3-DSDPEase 的残余酶活。由双变量 *t* 检验统计量分析, 在 0–48 h 之内, SAP1-DSDPEase 和 SAP3-DSDPEase

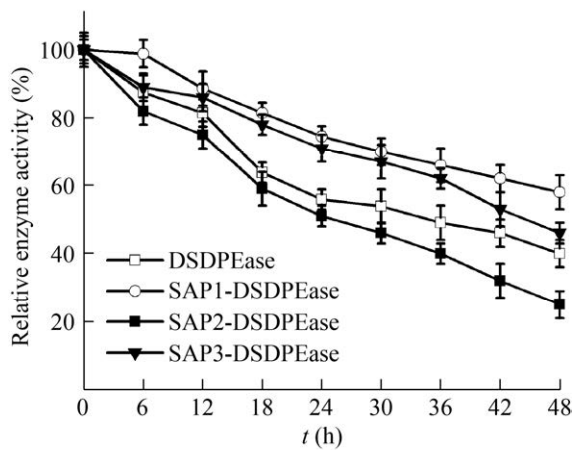


图3 SAPs对DSDPEase热稳定性的影响

Fig. 3 Effect of SAPs on the thermal stability of DSDPEase.

酶活力衰减速度与对照组 DSDPEase 相比较缓慢, 显著差异性均为显著 ($P \leq 0.05$), 但在 0–12 h 与 36–48 h, SAP1-DSDPEase 衰减速度比 SAP3-DSDPEase 衰减速度缓慢, 显著性差异为显著 ($P \leq 0.05$)。上述现象表明, 目的蛋白对不同的 SAPs 偏好性不同, 这与蛋白氨基酸序列和 SAPs 氨基酸序列有密切关系^[15]。

2.3 固定化细胞条件优化

2.3.1 海藻酸钠浓度对固定化细胞的影响

海藻酸钠浓度影响固定化细胞的机械强度、比表面积和传质效率等, 从而影响固定化细胞的酶活回收率。如图 4 所示, 海藻酸钠浓度越低, 形成的固定化微球体积小、比表面积大, 并且内部固定化结构孔径大、传质速率较高, 酶活回收率最高, 但是固定化小球的机械强度较低。随着海藻酸钠浓度升高, 酶活回收率逐渐下降, 机械强度增大。根据机械强度和相对酶活回收率, 2% 的海藻酸钠为宜。

2.3.2 细胞包埋量对固定化细胞的影响

细胞包埋量影响固定化细胞的酶活回收率与催化活性, 如图 5 所示, 当细胞包埋量 20 g/L 时, 酶活回收率较高, 固定化小球中的单位细胞传质效率较高, 但是催化活性相对偏低, 细胞量少会

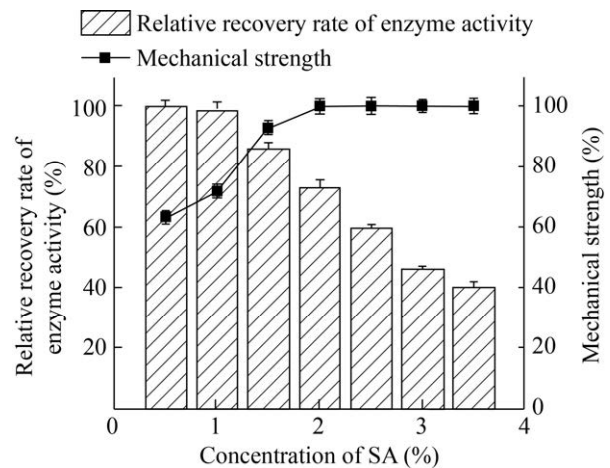


图4 海藻酸钠浓度对固定化细胞的影响

Fig. 4 Effect of SA concentration on immobilized cells.

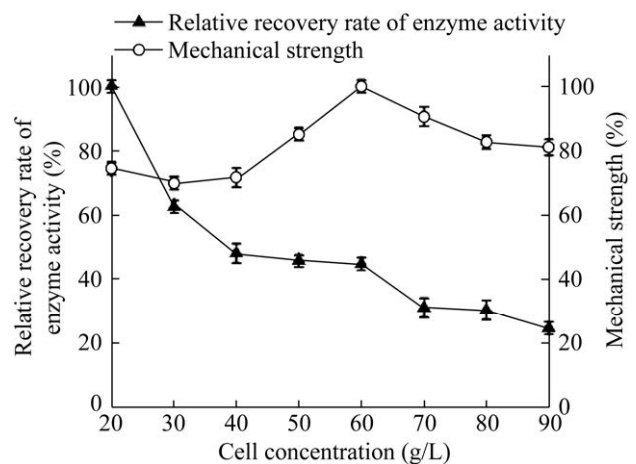


图5 细胞包埋量对固定化细胞的影响

Fig. 5 Effect of the amount of cells embedded on immobilized cells.

影响固定化小球的整体催化活性。细胞量增加导致固定化小球内部空间位阻增大、传质效率降低, 与等量的游离细胞相比催化活性明显下降, 故随之固定化细胞相对酶活回收率下降。当细胞包埋量 60 g/L 时, 相对活性最大, 更有利于固定化细胞在生产中发挥催化作用。

2.3.3 二氧化钛与海藻酸钠比例对固定化细胞的影响

二氧化钛与海藻酸钠的比例会影响固定化细胞的机械强度、酶活回收率。如图 6 所示, 当不添

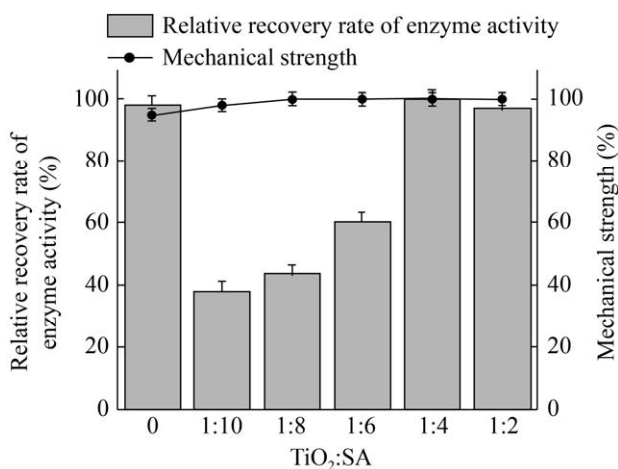


图6 二氧化钛的添加量对固定化细胞的影响

Fig. 6 Effect of titanium dioxide addition on immobilized cells.

加二氧化钛时,海藻酸钠包埋的固定化细胞空间位阻较小、传质效率较高,从而酶活回收率较高,但是机械强度相比添加二氧化钛的固定化细胞较差。当加入二氧化钛后,固定化细胞内部的空间位阻增大,酶活回收率呈现出下降趋势,随着固定化小球中二氧化钛比例增大,二氧化钛均匀分散在海藻酸钙凝胶孔隙中并吸附大量细胞,酶活回收率逐渐增大,机械强度保持良好,二氧化钛:海藻酸钠为1:4时,固定化细胞酶活回收率和机械强度最大。

2.3.4 钙离子浓度对固定化细胞的影响

钙离子与海藻酸钠离子交换形成海藻酸钙凝胶是固定化细胞的重要过程,如图7所示,固定化细胞在1% CaCl₂溶液中难以成型,机械强度较差仅有62%,细胞流失,导致酶活回收率较低。CaCl₂溶液进入细胞对酶活有抑制作用,当钙离子浓度超过2%时,固定化细胞酶活回收率呈现下降趋势。

2.3.5 戊二醛浓度对固定化细胞的影响

单独海藻酸钠包埋法固定化细胞容易泄露,戊二醛可以与海藻酸钠和细胞膜表面的氨基结合形成交联,如图8所示,戊二醛浓度在0.03%范围内不会对细胞酶活造成损伤,戊二醛浓度增大固定化细胞回收酶活率下降,随着戊二醛浓度的增大机械强度提高并趋于稳定。

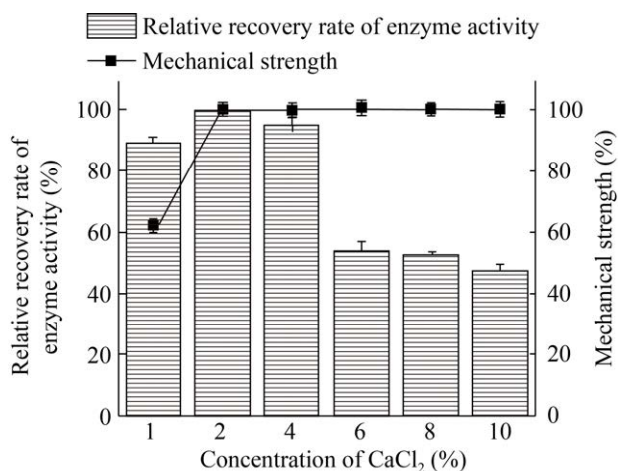


图7 钙离子浓度对固定化细胞的影响

Fig. 7 Effect of calcium ion concentration on immobilized cells.

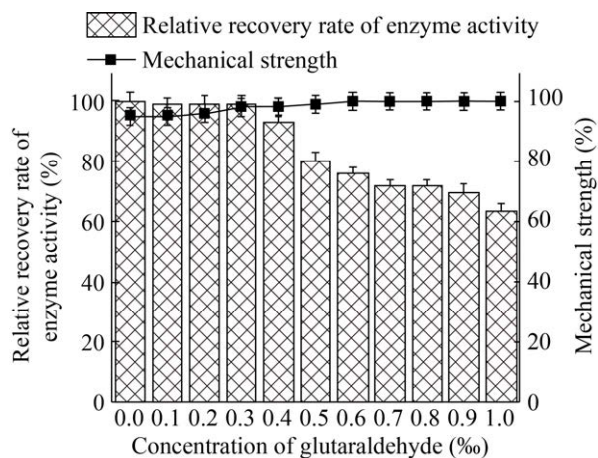


图8 戊二醛浓度对固定化细胞的影响

Fig. 8 Effect of glutaraldehyde concentration on immobilized cells.

2.4 固定化细胞最适反应温度与 pH

在相同温度下,固定化细胞与游离细胞相比,传质更慢,温度是影响反应速率的关键因素,如图9A所示,随着温度的升高,固定化细胞与游离细胞的相对活性均增大。固定化细胞和游离细胞的最适反应温度均为80℃,超过80℃,相对活性急剧下降至30.5%。

反应溶液的pH影响固定化细胞的催化活性,如图9B所示,在pH为3.0~5.0时,固定化细胞的相对活性较低,当pH升高到6.5时,固定化细

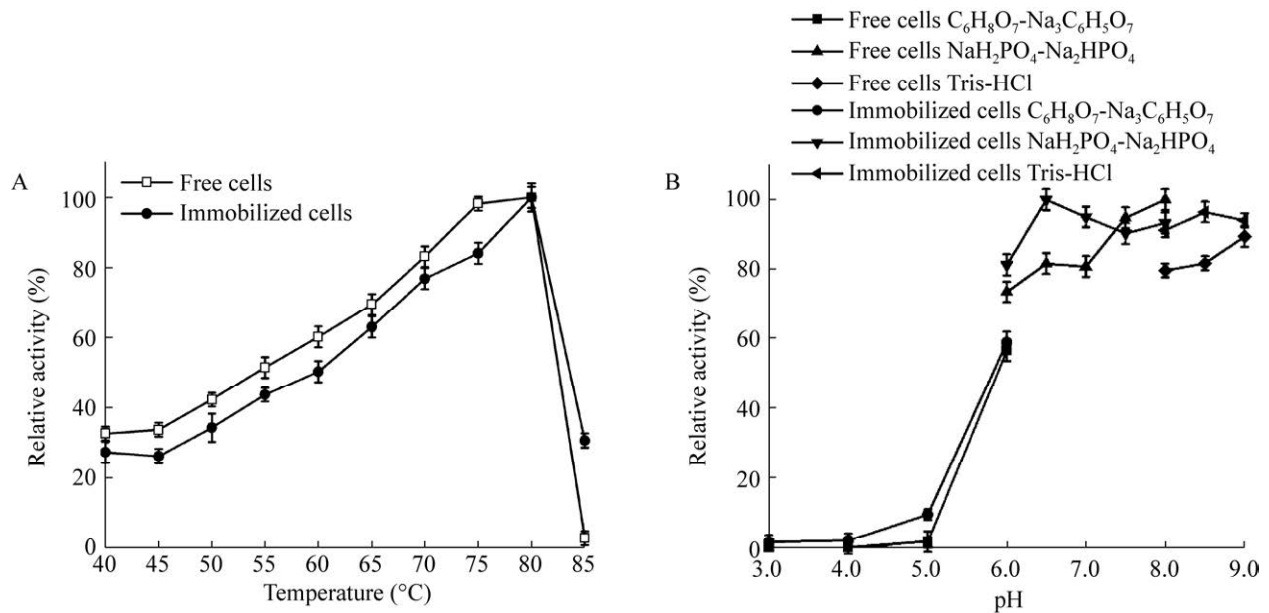


图9 固定化细胞最适反应温度与 pH

Fig. 9 Optimal reaction temperature (A) and pH (B) for immobilized cells.

胞相对活性最高,反应过程中观察到固定化细胞小球松散分离,这是在 pH 6.5 处相对活性提高的主要原因,关于稳定性分析见 2.5。在 pH 为 7.0–8.5 时,固定化细胞的相对活性都保持在 90% 左右,由此可见,在中性偏碱的条件下反应溶液的 pH 对固定化细胞的催化活性影响不大。

2.5 固定化细胞温度和 pH 的稳定性

称取适量固定化细胞,分别在 30–70 °C 水浴锅中过夜孵育 10 h,称取 0.5 g 测定残余酶活,其余做机械强度测定。如图 10A 所示,固定化细胞在 30 °C、40 °C 保存 10 h 残余酶活仍保持 100%,机械强度没有降低;在 50 °C,固定化细胞残余酶活力为 99.6%,机械强度为 98%;固定化细胞在 60 °C 的残余酶活为 68.1%,机械强度下降至 86%,然而 70 °C 下孵育 10 h 已丧失酶活力,考虑到已失去研究意义,不再讨论该温度下的机械强度。

将适量细胞置于 pH 6.0–8.5 的缓冲液中保存 5 h,用生理盐水洗涤 3 次,测定固定化细胞残余酶活与机械强度。如图 10B 所示,固定化细胞在

pH 6.0 的缓冲液中出现溶破现象,固定化材料被洗脱掉,细胞暴露相对活性较大,但机械强度仅有 85%,在 pH 6.5 的缓冲液中相对活性增大,机械强度依然是 85%。在 pH 7.0–8.5 的缓冲液中固定化细胞不被破坏,相对活性受传质影响低于最高残余酶活,但机械强度均为 100%,故认为固定化细胞在 pH 8.5 的环境下稳定性最好。

2.6 固定化细胞操作稳定性

固定化细胞在优化后的反应条件下,重复使用,如图 11 所示,随着使用批次的增多,海藻酸钠包埋的固定化细胞机械强度不耐受加热及搅拌剪切力的作用急剧下降,残余酶活回收率在第 3 批次下降至 60%,在第 5 批次固定化细胞酶活回收率仅有 30%,第 6 批次已无完整颗粒存在。二氧化钛-海藻酸钠复合包埋吸附的固定化细胞小球表现出极稳定的机械强度,从第 8 批次开始小球开始被溶破机械强度下降至 94%,残余酶活回收率保留 62%,连续操作 10 次,固定化小球机械强度依然维持在 80%,残余酶活回收率保留 58%。

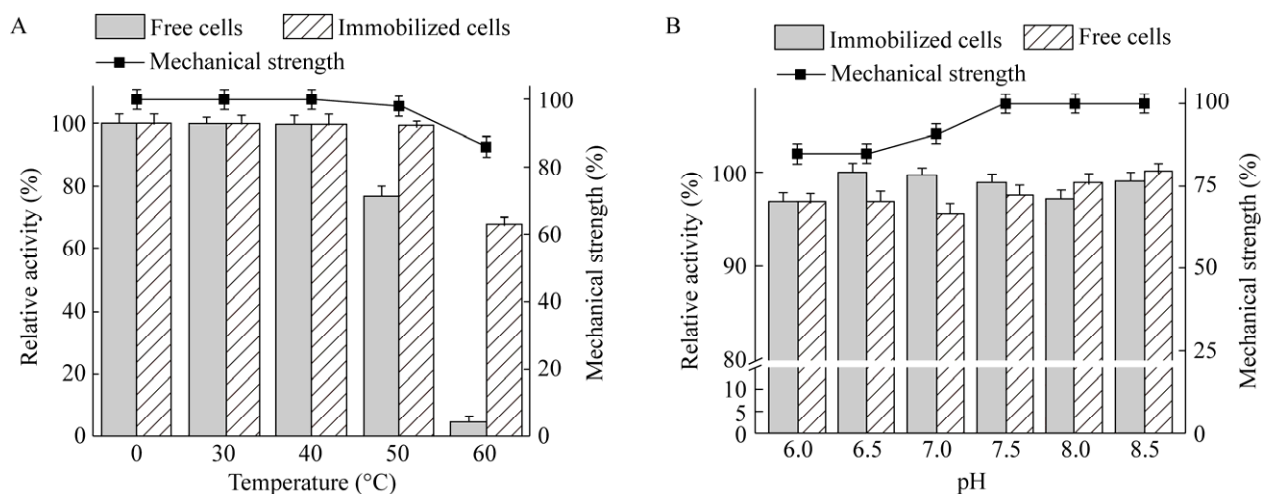


图 10 固定化细胞的热稳定性和 pH 稳定性

Fig. 10 Thermal (A) and pH (B) stability of immobilized cells.

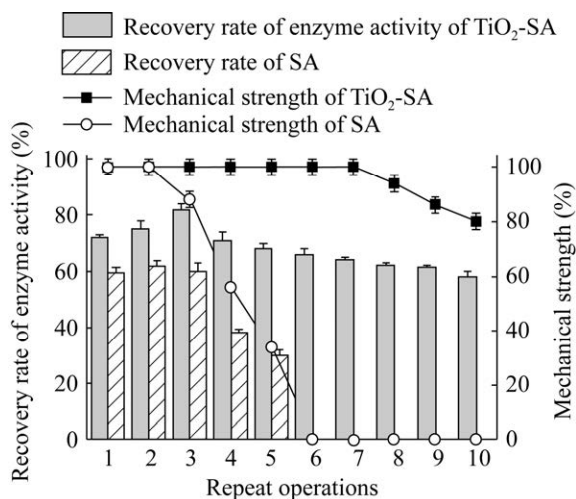


图 11 不同材料对固定化细胞操作稳定性的影响

Fig. 11 Effect of different materials on the operational stability of immobilized cells.

2.7 固定化细胞的应用

将固定化细胞加入到 500 g/L D-果糖溶液中, 50 °C、200 r/min, 反应时间 1.5 h (由预实验确定), 连续转化 10 次。固定化细胞转化率呈现出先上升后下降的趋势, 这是由于固定化细胞小球在溶液中浸泡溶胀, 细胞与底物接触面积增大, 转化效率逐渐增大, 直到细胞流失而导致转化效率下降。如图 12 所示, D-果糖生成 D-阿洛酮糖的转化率为 28.8%–30.7%。这一结果与已报道的相同基因来

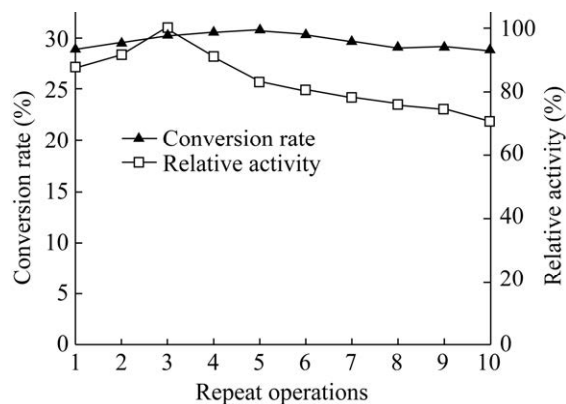


图 12 固定化细胞使用稳定性

Fig. 12 Stability of reused immobilized cells.

源的游离酶 DPEase 在 50 °C 条件下 31.8% 的转化率是接近的^[16]。在连续转化过程中, 固定化细胞残余酶活力的变化趋势与 2.6 中酶活回收率变化相符, 第 10 批次转化相对活性为 70.5%, 验证了二氧化钛-海藻酸钠-戊二醛固定化细胞重复使用的稳定性。

3 讨论

D-阿洛酮糖 3-差向异构酶是 D-果糖转化成 D-阿洛酮糖的关键酶, 由于该酶热稳定性和化学稳定性差, 不易与产物分离, 限制了其在工业化生产中的应用。固定化酶与游离酶相比不仅保持

催化反应的特异性、高效性,还能起到保护酶的作用,延长酶的使用周期,缩短生产分离的时间。李晓波^[17]利用壳聚糖包埋法固定化 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶,提高了酶的 pH 耐受性,但其热稳定性没有得到改善,固定化酶在 60 °C 保持 30 min 酶活几乎丧失。通常在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒杆菌中异源过表达 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶,均需要破细胞才能得到粗酶液。在食品领域中,何伟伟^[18]将重组枯草芽孢杆菌冷冻干燥,成功制作冻干酶制剂,应用到 D-阿洛酮糖的生产中。李秋喜等^[12]通过海藻酸钠戊二醛包埋交联法固定化 DPEase 重组细胞,酶活回收率 76%,重复操作 8 次后酶活回收率 61%。孙帆等^[11]利用硅藻土海藻酸钠吸附包埋重组枯草芽孢杆菌,细胞包埋量 50 g/L,酶活回收率 64%,重复 7 次操作,残余酶活保留 81%。海藻酸钠廉价易得,物理化学性质稳定,且无毒无异味,通常是固定化细胞的首选材料。李力等^[19]制备 L-谷氨酸氧化酶(LGOX)重组大肠杆菌的固定化细胞,海藻酸钠浓度 2.5%,CaCl₂ 溶液浓度 13 g/L,得到的固定化工程菌机械强度最好。

二氧化钛是一种粘附力强不易起化学变化的两性氧化物,美国食品药品监督管理局规定二氧化钛可以作为所有的食品白色素,可被添加在凉果类、果冻、果酱等食品中^[20]。董依慧等^[21]发现,介孔二氧化钛可吸附蛋白质,为固定化酶提供了新的载体。孟俊丽等为了改善海藻酸钠固定化酶微球的扩散性与酶活稳定性,通过金属阳离子交联二氧化钛-海藻酸杂化凝固定化木瓜蛋白酶,发现固定化酶中加入二氧化钛能有效减少酶的泄露^[22]。

本实验首先融合 SAPs 双亲短肽延长 DSDPEase 的半衰期,为游离重组细胞在收集存储过程中提供数据参考,然后制备二氧化钛-海藻酸钠复合载体固定化重组细胞并使用戊二醛交联,由于二氧化钛均匀分布在海藻酸钙结冷胶内部空间结构中,对细胞膜表面蛋白的吸附作用可有效阻止细胞泄露,使固定化细胞各组分之间交

联紧密疏松有秩,提高了固定化细胞与底物溶液的接触面积,从而有效提高固定化细胞的酶活回收和机械强度。通过单因素实验,以酶活回收率、机械强度为参考,对海藻酸钠、二氧化钛、钙离子、戊二醛浓度做了优化得出固定化细胞最优工艺参数:2%的海藻酸钠、1:4 的二氧化钛:海藻酸钠添加比例、2%的 CaCl₂、0.03%的戊二醛。固定化细胞未改变生物转化反应条件,但提高了热稳定性,并且固定化细胞的 pH 稳定性与游离细胞相近,添加二氧化钛后可显著增加固定化细胞的重复使用次数,重复操作 10 次,酶活回收率依然保持在 58%,机械强度为 80%。重复使用过程中,固定化细胞转化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的效率较高,连续使用 10 次转化率依然保持 28.8%。总之,本研究构建的重组菌株为改善 DPEase 热稳定性提供了参考,确定的固定化工艺参数为工业固定化细胞提供了重要的理论依据。

REFERENCES

- [1] Matsuo T, Suzuki H, Hashiguchi M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2002, 48(1): 77-80.
- [2] Hossain A, Yamaguchi F, Hirose K, et al. Rare sugar D-psicose prevents progression and development of diabetes in T2DM model Otsuka long-evans Tokushima fatty rats. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 525-535.
- [3] Jiang S, Xiao W, Zhu X, et al. Review on D-allulose: *in vivo* metabolism, catalytic mechanism, engineering strain construction, bio-production technology. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 26.
- [4] Itoh H, Sato T, Izumori K. Preparation of D-psicose from D-fructose by immobilized D-tagatose 3-epimerase. *J Ferment Bioeng*, 1995, 80(1): 101-103.
- [5] Izumori K, Yamakita M, Tsumura T, et al. Production of D-psicose from D-talitol, D-tagatose or D-galactitol by *Alcaligenes* sp. 701B. *J Ferment Bioeng*, 1990, 70(1): 26-29.
- [6] Mu W, Chu F, Xing Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(14): 7785-7792.

- [7] Lu XY, Liu S, Zhang DX, et al. Enhanced thermal stability and specific activity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoxygenase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(21): 9419-9427.
- [8] De Boer AS, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, 36(1): 1-4.
- [9] Furusaki S, Seki M. Use and engineering aspects of immobilized cells in biotechnology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1992, 46: 161-185.
- [10] 吴天飞, 潘建洪, 方从申, 等. 固定化细胞技术应用进展. *浙江化工*, 2020, 51(3): 10-13.
Wu TF, Pan JH, Fang CS, et al. Application progress of immobilized cells technology. *Zhejiang Chem Ind*, 2020, 51(3): 10-13 (in Chinese).
- [11] 孙帆, 宿玲恰, 张康, 等. D-阿洛酮糖3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及固定化细胞研究. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(7): 83-88.
Sun F, Su LQ, Zhang K, et al. D-psicose 3-epimerase gene overexpression in *Bacillus subtilis* and immobilization of cells. *China Biotechnol*, 2018, 38(7): 83-88 (in Chinese).
- [12] 李秋喜, 林春芳, 沐万孟, 等. 海藻酸钠固定细胞产D-阿洛酮糖的研究. *食品工业科技*, 2015, 36(7): 172-176.
Li QX, Lin CF, Mu WM, et al. Research of the immobilization of microbial cells in sodium alginate for D-psicose conversion. *Sci Technol Food Ind*, 2015, 36(7): 172-176 (in Chinese).
- [13] 李谔. *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-天冬酰胺酶的分子改造及表达优化[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
Li X. Molecular modification and expression optimization of *Pyrococcus yayanosii* CH1 L-asparaginase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [14] 赵群, 李静, 窦召语, 等. 海藻酸钠-聚乙烯醇复合固定醋酸菌研究. *中国调味品*, 2019, 44(12): 35-38.
Zhao Q, Li J, Dou ZY, et al. Study on the immobilization of acetic acid bacteria with sodium alginate and polyvinyl alcohol. *China Condiment*, 2019, 44(12): 35-38 (in Chinese).
- [15] 刘松, 汪明星, 堵国成, 等. 融合自组装双亲短肽提高碱性果胶酶热稳定性. *食品与发酵工业*, 2015, 41(11): 1-6.
Liu S, Wang MX, Du GC, et al. Improvement of thermal stability of alkaline polygalacturonate lyase by fusing with self-assembling amphipathic peptides. *Food Ferment Ind*, 2015, 41(11): 1-6 (in Chinese).
- [16] Zhang WL, Li H, Zhang T, et al. Characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 with an acidic pH optimum and a high specific activity. *J Mol Catal B: Enzym*, 2015, 120: 68-74.
- [17] 李晓波. D-阿洛酮糖3-差向异构酶的表达及其固定化转化D-阿洛酮糖的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
Li XB. Expression and immobilization of D-psicose 3-epimerase and its application in the production of D-psicose[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2013. (in Chinese)
- [18] 何伟伟. D-阿洛酮糖3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的高效表达及应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
He WW. Efficient expression of D-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* and its application[D]. Wuxi, China: Jiangnan University, 2017. (in Chinese)
- [19] 李力, 王亚平, 饶彝, 等. 重组L-谷氨酸氧化酶固定化细胞的制备. *湖北农业科学*, 2019, 58(17): 132-135.
Li L, Wang YP, Rao B, et al. Preparation of recombinant L-glutamate oxidase immobilized cells. *Hubei Agric Sci*, 2019, 58(17): 132-135 (in Chinese).
- [20] 王江雪, 李炜, 刘颖, 等. 二氧化钛纳米材料的环境健康和生态毒理效应. *生态毒理学报*, 2008, 3(2): 105-113.
Wang JX, Li W, Liu Y, et al. Environmental health and ecotoxicological effect of titanium dioxide nanomaterials. *Asian J Ecotoxicol*, 2008, 3(2): 105-113 (in Chinese).
- [21] 董依慧, 安蓉, 庄伟, 等. 介孔TiO₂对不同蛋白的选择性固定化性能. *化工学报*, 2014, 65(5): 1750-1758.
Dong YH, An R, Zhuang W, et al. Mesoporous TiO₂ with different selectivities of protein immobilization performance. *CIESC J*, 2014, 65(5): 1750-1758 (in Chinese).
- [22] 孟俊丽, 吴敏, 丁稳, 等. 金属阳离子交联TiO₂-海藻酸杂化凝胶(英文). *东南大学学报(英文版)*, 2014, 30(4): 526-530.
Meng JL, Wu M, Ding W, et al. Metal cation crosslinking of TiO₂-alginate hybrid gels. *J Southeast Univ (Engl Ed)*, 2014, 30(4): 526-530 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)