

L-鼠李树胶糖激酶在 D-阿洛酮糖合成中的应用

温俊婷^{1,2}, 李子杰^{1,2}, 高晓冬^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: D-阿洛酮糖-3-差向异构酶(D-psicose-3-epimerase, DPE)可以催化D-果糖和D-阿洛酮糖之间的可逆反应,但D-阿洛酮糖的产率较低。L-鼠李树胶糖激酶(L-rhamnulose kinase, RhaB)具有磷酸化酮糖类物质的活性,将其与 DPE 偶联,可以打破 DPE 的可逆平衡,从而提高 D-阿洛酮糖的产率。在反应体系中引入多聚磷酸盐激酶(polyphosphate kinase, PPK),可实现 ATP 的再生,降低反应的成本。本实验在大肠杆菌 Rosetta(DE3)中分别过表达 DPE、RhaB 和 PPK,优化其反应条件,计算产物得率。结果表明,RhaB 的相对分子质量约为 5.3×10^4 ,最适 pH 和温度为 8.0 和 35 ℃。将 DPE 和 RhaB 偶联,最适条件如下:pH 8.5,温度 35 ℃,最适金属离子 Mg^{2+} ,DPE 和 RhaB 酶量比(质量比)1:2,产物得率为 70%。将 DPE、RhaB 和 PPK 偶联,ATP 浓度降为 D-果糖的 1/5,D-阿洛酮糖得率为 50%。本研究为工业化生产D-阿洛酮糖提供理论依据。

关键词: D-阿洛酮糖;L-鼠李树胶糖激酶;D-阿洛酮糖-3-差向异构酶;多聚磷酸盐激酶

中图分类号:Q 814.9 文章编号:1673-1689(2020)12-0049-08 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.12.008

Application of L-rhamnulose Kinase on Production of D-psicose

WEN Juntong^{1,2}, LI Zijie^{1,2}, GAO Xiaodong^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: D-psicose can be produced from D-fructose using D-psicose-3-epimerase (DPE). However, the reaction catalyzed by DPE is reversible, which eventually reaches equilibrium between the D-fructose and D-psicose leading to a low conversion rate. L-rhamnulose kinase (RhaB) catalyzes the phosphorylation of ketoses in an irreversible way. In a cascade reaction based on the combination with DPE, RhaB can break the equilibrium by phosphorylating the D-psicose. Thus, an increased production of D-psicose can be expected. Polyphosphate kinase (PPK) is overexpressed in the cascade reaction to establish the ATP-regeneration system in order to reduce the industrial costs. DPE, RhaB and PPK were overexpressed in *E. coli* Rosetta (DE3) respectively to explore the optimum condition and the product yield. RhaB protein with a molecular weight of 5.3×10^4 was thus achieved at pH 8.0 under 35 ℃. When RhaB coupled with DPE, the consequent yield of D-psicose could reach 70% under optimum condition, i.e., pH 8.5, 35 ℃, Mg^{2+} and DPE:RhaB of 1:2. In the cascade reaction of DPE and RhaB combined with PPK, the ATP concentration was reduced to 1/5 of D-fructose and the yield of D-psicose was 50%. The results provide a theoretical basis for the

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(21778023)。

* 通信作者: 高晓冬(1965—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事细胞分子生物学和生物化学研究。E-mail:xdgao@jiangnan.edu.cn

industrial production of D-psicose.

Keywords: D-psicose, L-rhamnulose kinase, D-psicose-3-epimerase, polyphosphate kinase

稀有糖(rare sugar)指自然界中存在但含量极少的一类单糖及其衍生物^[1]。目前已发现 34 种稀有糖及糖醇^[2],包括 D-阿洛酮糖、D-塔格糖、D-阿洛糖等。稀有糖具有独特的生物活性,可作为添加剂改善食品的理化性质^[3],发挥多种生理功能^[4-5],因此在食品、保健、医药等领域引起了广泛关注。

D-阿洛酮糖(D-psicose)属于稀有糖中的一种,其甜度为蔗糖的 70%,但能量仅为蔗糖的 0.3%,具有低热量的特性,可作为蔗糖的食用性替代物^[6-7]。随着稀有糖研究的不断推进,D-阿洛酮糖受到了广泛的关注,其在医疗、保健方面具有显著功效,如降血糖^[8]、降血脂^[9],因而非常适用于糖尿病患者的食用^[10]。另外,D-阿洛酮糖可以作为肝脂酶^[11]和肠道 α -糖苷酶的抑制剂,减少脂肪堆积^[12],具有减肥功效。

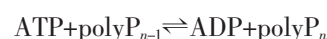
D-阿洛酮糖在自然界中含量极少,主要存在于小麦、鼠刺植物以及甜菜糖蜜中^[13-14]。目前应用较广泛的合成方法为化学合成法和生物合成法。相较于化学合成法,生物合成法的优势更为突出,例如反应条件温和、副产物少、利于目的产物的纯化,因此更适合工业化生产^[15]。

目前最常见的酶法合成方法是利用 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶(D-psicose-3-epimerase,DPE)催化D-果糖和D-阿洛酮糖之间的转化^[16-17]。但由于DPE催化的异构化反应是一个可逆的过程,所以D-阿洛酮糖的产率较低^[18]。因此,如何提高异构化反应的转化率是生产D-阿洛酮糖所面临的重大挑战。

L-鼠李树胶糖激酶(L-rhamnulose kinase,RhaB)是己糖激酶-hsp70-超蛋白家族成员^[19],其N端结构域是ATP的结合位点,可以控制ATP的结合过程。RhaB是一种底物特异性激酶^[20],同时也是大肠杆菌体内代谢L-鼠李糖所涉及的关键酶之一^[21]。其催化的底物为C3-R构型的稀有糖,如D-阿洛酮糖。它的催化机制为:将D-阿洛酮糖磷酸化生成D-阿洛酮糖-1-磷酸,同时消耗一分子ATP,生成对应的ADP。由于RhaB催化的反应为不可逆过程,因此将异构酶DPE与RhaB串联,可以破坏异构化反应的平衡,从而提高D-阿洛酮糖的产率,有利于工

业化生产。

多聚磷酸盐激酶(polyphosphate kinase,PPK)分为2种:多聚磷酸盐激酶1(PPK1)和多聚磷酸盐激酶2(PPK2),其中PPK1主要负责多聚磷酸盐(polyphosphate,polyP)的合成以及ATP的代谢(合成)^[22],参与的酶促反应为:



PPK2主要负责GTP的代谢,大肠杆菌中只有PPK1,不存在PPK2^[23]。由于PPK1催化的反应为可逆过程,当ATP/ADP值偏低时,PPK1可催化ADP转化为ATP^[24]。因此,本文中主要利用大肠杆菌来源的PPK1参与的ATP再生过程,以减少反应中ATP的用量和ADP的积累,从而降低合成D-阿洛酮糖的成本。

本研究中将重组蛋白RhaB在大肠杆菌中大量表达,以D-阿洛酮糖为底物,研究RhaB的酶学性质,并对纯酶RhaB的反应条件进行优化。同时,将梭状芽孢杆菌(*Clostridium cellulolyticum* H10)来源的DPE和大肠杆菌来源的RhaB酶偶联,以D-果糖为底物,优化偶联体系的反应条件,计算反应的转化率。最后,将DPE、RhaB和PPK(*E. coli*)三酶偶联,降低ATP的用量,合成D-阿洛酮糖。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒和菌株 pET-28a质粒:购于Novagen公司;pET28a-rhaB、pET28a-ppk:作者所在实验室构建;大肠杆菌MG1655和Rosetta(DE3):作者所在实验室保存;pET28a-dpe:作者所在实验室前期构建的质粒。

1.1.2 酶、试剂及耗材 限制性内切酶和DNA连接酶:购于TaKaRa生物公司;腺苷-5'-三磷酸二钠盐(ATP)和多聚磷酸盐(polyphosphate,polyP):购于上海生工生物公司;卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、酸性磷酸酶(acid phosphatase from sweet potato,AP):购于Sigma-Aldrich公司;Ni²⁺亲和层析柱:购于GE公司;D-果糖:购于阿拉丁有限公司;D-阿洛酮糖:购于TCI(上海)化成工业发展有

限公司;C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm)和 Sugar-Pak™ 色谱分析柱(300 mm×6.5 mm):购于 Waters 公司。

1.1.3 培养基及其他溶液配制 TB 培养基:酵母抽提物(24 g/L),胰蛋白胨(12 g/L),K₂HPO₄·3H₂O(16.4 g/L),KH₂PO₄(2.31 g/L),甘油体积分数 0.4%。LB 固体培养基:胰蛋白胨(10 g/L),酵母抽提物(5 g/L),NaCl(10 g/L),琼脂粉(20 g/L);湿热灭菌 121 °C,20 min。

蛋白质纯化缓冲液:1)裂解、平衡缓冲液:25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl;洗涤缓冲液:25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl,60 mmol/L imidazole;2)洗脱缓冲液:25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),150 mmol/L NaCl,500 mmol/L imidazole;3)脱盐缓冲液:25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0),50 mmol/L NaCl。

1.2 仪器与设备

PCR 分析仪: Eppendorf 公司产品;Bio-Rad Power/PAC300 电泳仪:美国伯乐公司产品;高效液相色谱仪 HPLC:日本日立公司产品;超声波细胞粉碎机:南京新辰生物科技有限公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 重组质粒的构建 采用 PrimeSTAR 聚合酶进行 PCR 时,以大肠杆菌 BL21 菌液为模板,以 *rhaB*-F:5'-GCGCGGATCCATGACCTTTCGCAATTG TGTC-3'(BamH I)为上游引物,以 *rhaB*-R:5'-GCG CAAGCTTTCATGCGCAAAGCTCCTTTGT -3'(Hind III)为下游引物来扩增 *rhaB* 基因。采用 BamH I 和 Hind III 2 种限制性内切酶分别对 pET-28a 和 *rhaB* 基因进行双酶切处理,37 °C 静置 3 h。反应结束后,对酶切产物进行胶回收,并用 DNA 连接酶 ligation-mix 将基因片段和质粒片段进行连接,16 °C 静置 2 h。将连接产物转入大肠杆菌感受态,冰浴 25 min,42 °C 热激 40 s,冰上放置 3 min。将转化产物涂布于带有卡那霉素抗性的平板进行筛选,挑取转化子进行菌落 PCR 鉴定,并进行质粒提取、酶切验证和基因测序,从而得到正确编码的表达载体 pET28a-*rhaB*。pET28a-*dpe* 为作者所在实验室前期构建的质粒。pET28a-*ppk* 的构建方法同上。

1.3.2 重组蛋白在大肠杆菌中的诱导表达 将重组质粒 pET28a-*rhaB* 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3)中,转化步骤同上,涂布到 LB-Kan 平板上,37 °C 过夜培养,挑取正确的转化子在 5 mL LB-Kan 培养基

中 37 °C 过夜培养后,取 500 μL 培养基,离心收集菌体作为诱导前样品,另取 2 mL 转接入 200 mL TB-Kan 培养基中,37 °C 摇床培养 3~4 h,待 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 诱导(终浓度 0.1 mmol/L),16 °C 诱导 20 h,取 500 μL 培养基,离心收集菌体作为诱导后样品,另取 5 mL 菌体超声破碎离心,分别取上清液和沉淀用于 SDS-PAGE 检测。剩余培养基收集菌体,-20 °C 保存待用。

1.3.3 重组蛋白的分离纯化及脱盐 菌体收集后,平衡缓冲液清洗 2 遍,用 10 mL 平衡缓冲液充分悬浮菌体,超声破碎,4 °C 下超声 5 s 间歇 5 s,超声时间共为 30 min。结束后 12 000 g 离心 30 min,收集上清液,用于蛋白质纯化。破碎上清液中存在大量杂蛋白质,采用 Ni²⁺亲和层析柱对其进行纯化,可以得到高浓度、纯净的目的蛋白。蛋白质纯化步骤如下:取 30 mL 去离子水清洗 Ni²⁺亲和层析柱,约 6 个柱体积;10 mL 0.1 mol/L NiSO₄ 再生柱子,去离子水洗掉柱子中多余 Ni²⁺;20 mL 平衡缓冲液平衡 Ni²⁺亲和层析柱,约 4 个柱体积;缓慢上样,使上清液中蛋白质与 Ni²⁺柱充分结合;取 20 mL 平衡缓冲液再次平衡 Ni²⁺亲和层析柱,洗掉未结合的蛋白质;20 mL 洗涤缓冲液平衡 Ni²⁺亲和层析柱,利用低浓度咪唑洗掉与 Ni²⁺柱结合较弱的杂蛋白质;20 mL 洗脱缓冲液平衡 Ni²⁺亲和层析柱,利用高浓度咪唑洗脱并收集与 Ni²⁺柱结合较强的目的蛋白;20 mL 0.1 mol/L EDTA 洗掉 Ni²⁺;最后 20 mL 0.1 mol/L NaOH 保存柱子。

由于最后收集到的洗脱液里含有高浓度的咪唑和 NaCl,为避免其影响后续反应,需要进行脱盐处理。纯化后的蛋白质经由超滤管进行浓缩,4 °C 下,4 000 g 离心 30 min,并换用脱盐缓冲液以降低蛋白质中的盐浓度。最后,利用 BCA 蛋白质浓度检测试剂盒精确检测目的蛋白浓度,分装后加入甘油,-80 °C 长期保存。DPE、PPK 的表达纯化步骤与 RhaB 一致。

1.3.4 重组蛋白 RhaB 活性测定方法 检测 RhaB 的活性反应条件(250 μL 反应体系)如下:在 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)缓冲液中,加入 D-阿洛酮糖 5 g/L,5 mmol/L Mg²⁺,30 mmol/L ATP,0.2 g/L RhaB,在 35 °C 反应 30 min 后,用高浓度 NaOH 调 pH,终止反应。15 000 g 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 的水膜除去杂质,通过高效液相色谱

(HPLC)检测是否有产物的产生。利用色谱柱 C_{18} 来测定反应液中 ATP 和 ADP 的含量。HPLC 工作条件: 0.1 mol/L KH_2PO_4 (pH 6.25) 作为流动相, 流速 1 mL/min, 柱温箱温度 25 $^{\circ}C$, 用紫外检测器进行检测 ($\lambda=254$ nm)。

1.3.5 DPE 和 RhaB 偶联体系的活性测定方法 检测 DPE 和 RhaB 偶联体系的活性反应条件 (250 μ L 反应体系) 如下: 在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 加入 D-果糖 5 g/L, Mg^{2+} 5 mmol/L, ATP 30 mmol/L, DPE 0.2 g/L, RhaB 0.4 g/L, 在 35 $^{\circ}C$ 反应 30 min 后, 100 $^{\circ}C$ 灭活 10 min, 15 000 g 离心取上清液, 将 pH 值调为 5.0 左右, 外加酸性磷酸酶 AP (0.8 μ L) 处理, 30 $^{\circ}C$ 静置过夜。反应结束后, 将 pH 值调回 7.0 左右, 100 $^{\circ}C$ 加热 10 min, 终止反应。15 000 g 离心, 上清液过 0.22 μ m 的水膜除去杂质, 利用 Sugar-PakTM 色谱分析柱来检测产物 D-阿洛酮糖的生成量。HPLC 工作条件: 流动相为 500 mg/L EDTA 钙盐, 其流速为 0.5 mL/min, 柱温 80 $^{\circ}C$, RI 示差检测器。

1.3.6 DPE、RhaB 和 PPK 偶联体系的活性测定方法 检测 DPE、RhaB 和 PPK 偶联体系的活性反应条件 (250 μ L 反应体系) 如下: 在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 加入 D-果糖 5 g/L, Mg^{2+} 5 mmol/L, ATP 6 mmol/L, polyphosphate 6 mmol/L, DPE 0.2 g/L, RhaB 0.4 g/L, PPK 0.4 g/L, 在 35 $^{\circ}C$ 反应 1 h 后, 后续步骤参照 1.3.5。

1.3.7 重组蛋白 RhaB 反应条件的优化 温度和 pH 对 RhaB 活性的影响均以 1.3.4 中所提到的反应体系为基础, 反应时间均为 30 min。相对酶活定义为各组样品转化率相对于最高转化率所占的百分比。为了测定温度对 RhaB 活性的影响, 以 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 作为缓冲液, 采用不同温度 (10~70 $^{\circ}C$) 测定 RhaB 的酶活。为了测定不同 pH 对 RhaB 活性的影响, 采用 3 种不同缓冲液测定酶活, pH 5.0~7.0 为磷酸缓冲液, pH 7.0~9.0 为 Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0~11.0 为 Glycine-NaOH 缓冲液。

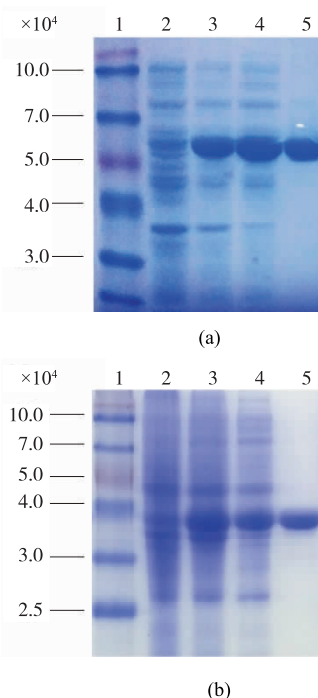
1.3.8 DPE 和 RhaB 偶联体系的条件优化 为了测定温度对偶联体系活性的影响, 反应体系参照 1.3.5。采用不同温度 (10~70 $^{\circ}C$) 测定酶活, 反应时间为 30 min。为了测定不同 pH 对偶联体系活性的影响, 采用 3 种不同缓冲液测定酶活, pH 5.0~7.0 为磷酸缓冲液, pH 7.0~9.0 为 Tris-HCl 缓冲液, pH 9.0~

11.0 为 Glycine-NaOH 缓冲液。为了测定金属离子对偶联体系活性的影响, 选取 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 以及 Mn^{2+} 等 8 种离子测定酶活。为了测定 DPE 和 RhaB 酶比例对偶联体系活性的影响, 采用不同的酶质量比 (1:4、1:2、1:1、2:1、4:1) 测定酶活, 其他条件不变。

2 结果与讨论

2.1 RhaB 和 DPE 在大肠杆菌中的表达

根据大肠杆菌来源的 *rhaB* 基因的理论碱基序列长度, 软件预测出其蛋白质相对分子质量为 5.3×10^4 。SDS-PAGE (见图 1(a)) 显示, 经 IPTG 诱导 20 h 后, 样品在 $5.0 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^4$ 之间有清晰的目的条带, 相对分子质量在 5.3×10^4 左右, 与预测大小基本一致。同时, RhaB 蛋白质大量表达在上清液中, 经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后可得到纯度较高的目的蛋白。同理, DPE 的相对分子质量大小为 3.4×10^4 , 与理论值吻合 (见图 1(b))。



1: 蛋白质 marker; 2: 诱导前全细胞; 3: 诱导 20 h 的全细胞; 4: 细胞裂解液上清液; 5: 纯化后蛋白质。

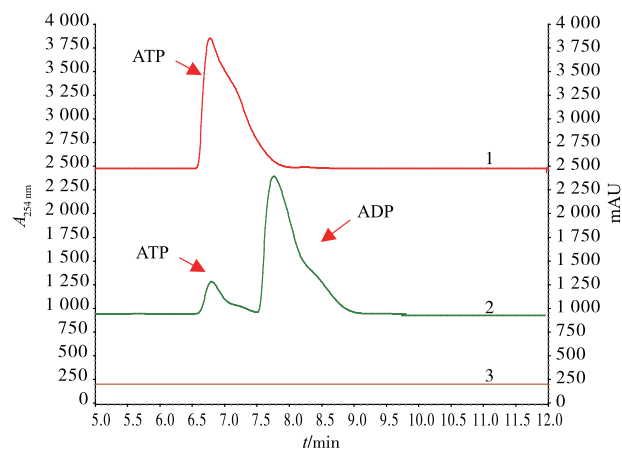
图 1 SDS-PAGE 检测 RhaB 和 DPE 的表达

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of RhaB and DPE expression

2.2 RhaB 的酶活性分析

RhaB 磷酸化 D-阿洛酮糖生成 D-阿洛酮糖-1-磷酸, 后者是一种比较昂贵的磷酸化单糖, 目前在市场上难以获得, 因此本研究中通过检测另一副产

物ADP的生成来验证 RhaB 酶活性。由图 2 可知,反应初始,体系中仅含有 ATP;反应 30 min 后,ATP 的峰值降低,ADP 的峰生成,加入脱磷酸酶 AP 后,ATP 和 ADP 的峰均消失。由此说明 RhaB 的确催化 D-阿洛酮糖生成 D-阿洛酮糖-1-磷酸,并将 ATP 转化成 ADP。



1:反应 0 min;2:反应 30 min;3:反应 30 min 后加入 AP 酶。

图 2 HPLC 检测 RhaB 的活性

Fig. 2 Activity of RhaB detected by HPLC

2.3 温度、pH 对 RhaB 活性的影响

研究温度、pH 对 RhaB 活性的影响,如图 3(a)所示,当温度为 35 ℃时,RhaB 活性最高,且耐受温度范围较广;在 10 ℃时,活性仍可达到 60%以上,在 60 ℃的高温下仍保有 80%左右的酶活;但当温度高于 70 ℃时,酶活逐渐丧失。根据报道,来自海栖热袍菌 MSB8 (*Thermotoga maritima* MSB8) 的 RhaB 最适反应 pH 值为 8.0^[25]。由图 3(b)可知,来自大肠杆菌的 RhaB 最适 pH 值为 8.0,且该酶在弱酸或弱碱下,仍保有 50%以上的酶活。

2.4 温度、pH 对 DPE 和 RhaB 偶联体系活性的影响

由 2.3 可知,RhaB 酶的最适温度为 35 ℃,而文献报道 DPE 酶的最适温度为 55 ℃,二者相差较大,因此需要确定偶联体系的最适反应温度。如图 4(a)所示,偶联体系在 35 ℃时拥有最高酶活,温度继续升高后,酶活逐渐下降。另外,RhaB 和 DPE 对外界温度的变化均有较强的适应性,在 10~70 ℃范围内,酶活可以保持在 51%以上。由图 4(b)可知,当 pH 值为 8.5 时,整个体系的酶活性最高;当 pH 偏酸性时,酶活性迅速降低,仅有 10%;当外界环境偏碱性时,酶活趋势稍有下降,但仍保持在 50%以上。因

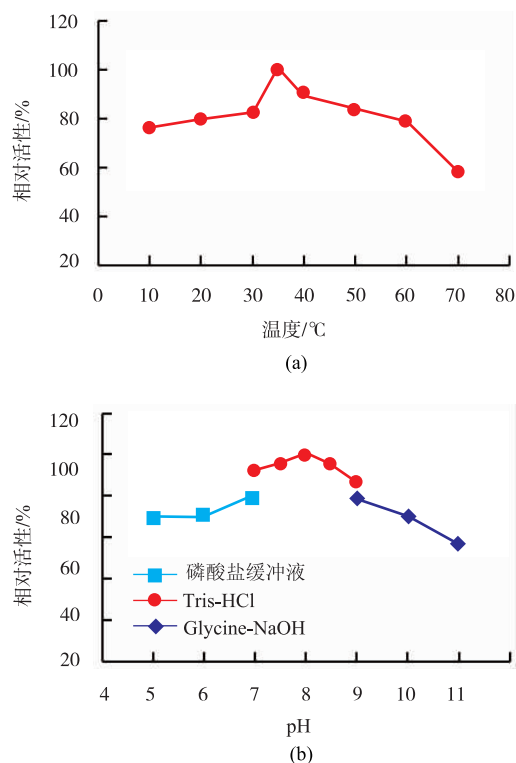


图 3 温度、pH 对 RhaB 活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature and pH on RhaB activity

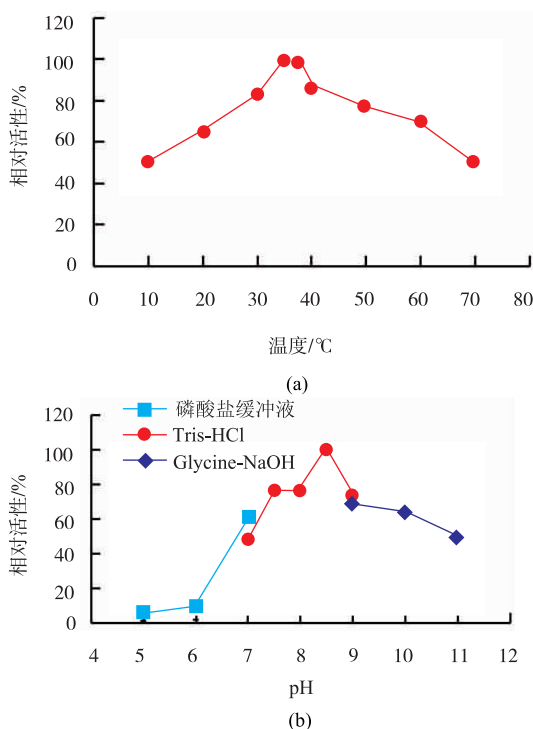


图 4 温度、pH 对 DPE 和 RhaB 偶联体系活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature and pH on the activity of DPE and RhaB

此,该反应更适合于在碱性环境下进行。

2.5 金属离子、酶质量比对 DPE 和 RhaB 偶联体系活性的影响

由文献报道可知,DPE 是 Co^{2+} 依赖型酶,而 RhaB 是一种激酶,因此需要研究金属离子对偶联体系酶活的影响。如图 5(a)所示, Co^{2+} 存在条件下,反应的转化率最高,其次是 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} ;相比于不加金属离子,多数离子显著提高了酶活,但 Cu^{2+} 却使酶活降低。考虑到 Co^{2+} 属于工业重金属离子,本实验选择 Mg^{2+} 加入反应体系中。如图 5(b)所示,当 DPE 和 RhaB 的质量比为 1:2 时,该体系的转化率最高,可达 70%;随着 DPE 所占比例的提高,反应的转化率逐渐降低。因此,RhaB 的酶质量应为 DPE 的 2 倍。

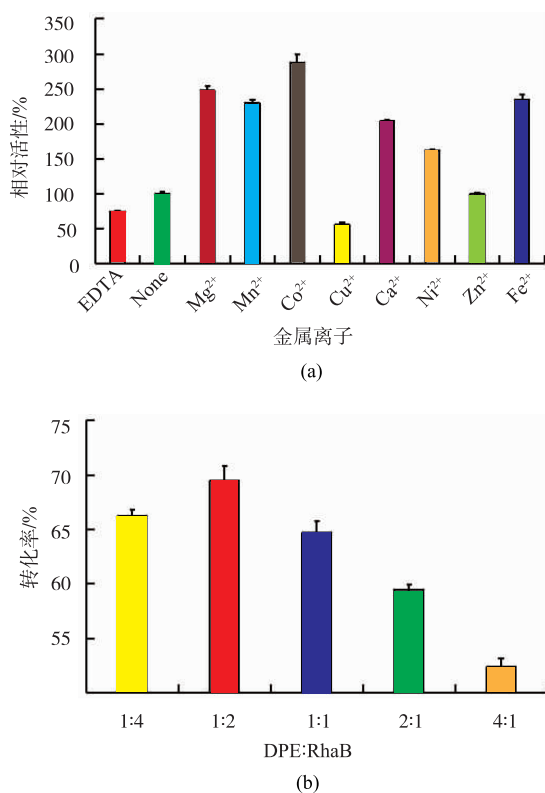


图 5 各种金属离子、酶质量比对 DPE 和 RhaB 偶联体系活性的影响

Fig. 5 Effect of various metal ions and enzyme ratios on the activity of DPE and RhaB

2.6 DPE 和 RhaB 偶联体系的活性

本实验在上述最适条件下,以 D-果糖为底物,在 DPE 和 RhaB 共同催化下合成 D-阿洛酮糖-1-磷酸,外加酸性磷酸酶 AP 处理后,可得到产物 D-阿洛酮糖,利用 Sugar-Pak™ 色谱分析柱检测 D-阿洛酮

糖的生成,如图 6 所示,D-果糖和 D-阿洛酮糖的出峰时间分别为 11.6 min 和 16.1 min。根据 HPLC 结果计算可得:偶联体系的反应转化率约为 70%,该体系显著提高了 D-阿洛酮糖的得率。

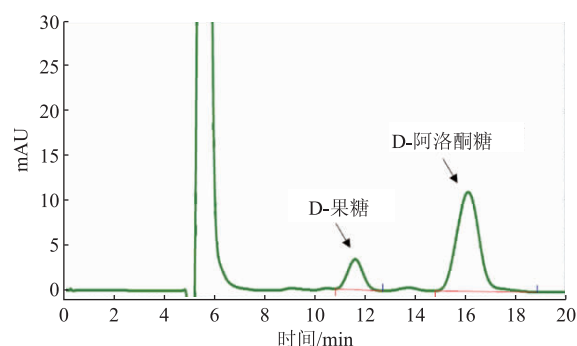
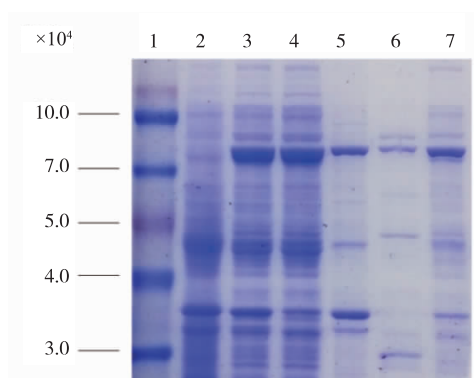


图 6 HPLC 分析 DPE 和 RhaB 偶联体系的活性

Fig. 6 Activity of DPE and RhaB detected by HPLC

2.7 PPK 在大肠杆菌中的表达

根据大肠杆菌来源的 *ppk* 基因的理论碱基序列长度,软件预测出其蛋白质相对分子质量为 8.0×10^4 。SDS-PAGE(见图 7)显示,相对分子质量在 8.0×10^4 左右,与预测大小基本一致。同时,PPK 蛋白质大量表达在上清液中,纯化后所得目的蛋白质较少,再对蛋白质进行浓缩除盐,结果发现 PPK 的蛋白质质量明显增多,但同时含有一定的杂蛋白质。



1:蛋白质 marker;2:诱导前全细胞;3:诱导 20 h 的全细胞;4:细胞裂解液上清液;5:细胞裂解液沉淀;6:纯化后蛋白质;7:浓缩后蛋白质。

图 7 SDS-PAGE 检测 PPK 的表达

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of PPK expression

2.8 DPE、RhaB 和 PPK 偶联体系的活性

本实验在上述反应条件的基础上,以 D-果糖为底物,同时将 ATP 用量降低至原来的 1/5,在 DPE、RhaB 和 PPK 共同催化下合成 D-阿洛酮糖-1-磷酸,外加酸性磷酸酶 AP 处理后,可得到产物 D-阿

洛酮糖,利用 Sugar-Pak™ 色谱分析柱检测 D-阿洛酮糖的生成,如图 8 所示,其中,图 8(a)对照组为 DPE 和 RhaB 双酶混合,图 8(b)实验组为 DPE、RhaB 和 PPK 三酶混合。根据 HPLC 结果计算可得,在降低 ATP 用量的条件下,双酶体系的转化率仅有 27%,而三酶偶联体系的反应转化率可达到 50%,因此,该体系显著提高了 D-阿洛酮糖的得率。

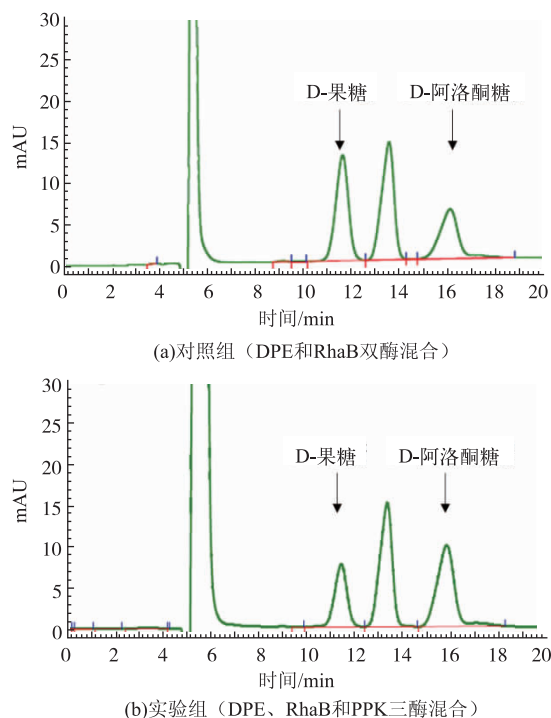


图 8 HPLC 分析 DPE、RhaB 和 PPK 偶联体系的活性

Fig. 8 Activity of DPE, RhaB and PPK detected by HPLC

参考文献:

- [1] LI Z J, GAO X D, CAI L. Synthesis of rare pentoses using microbial and enzymatic reactions[J]. *Current Organic Chemistry*, 2016, 20(14): 1456-1464.
- [2] PAYNE A N, CHASSARD C, LACROIX C, et al. Gut microbial adaptation to dietary consumption of fructose, artificial sweeteners and sugar alcohols: implications for host-microbe interactions contributing to obesity[J]. *Obesity Reviews*, 2012, 13(9): 799-809.
- [3] SUN Y, HAYAKAWA S, OGAWA M, et al. Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose[J]. *Food Control*, 2007, 18(3): 220-227.
- [4] SUI L, NOMURA R, DONG Y, et al. Cryoprotective effects of D-allose on mammalian cells[J]. *Cryobiology*, 2007, 55(2): 87-92.
- [5] HIRATA Y, SAITO M, TSUKAMOTO I, et al. Analysis of the inhibitory mechanism of D-allose on MOLT-4F leukemia cell proliferation[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(5): 562-568.
- [6] TSENG W C, CHEN C N, HSU C T, et al. Characterization of a recombinant D-allulose 3-epimerase from *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 and identification of an important interfacial residue[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 767-774.

3 结 语

D-阿洛酮糖是一种功能性稀有糖,具有多种生理活性,市场价格较高。其合成方法主要为利用 DPE 催化 D-果糖直接转化为 D-阿洛酮糖,但此反应为可逆过程,转化率较低。本研究将 DPE 催化的异构化反应与 RhaB 参与的磷酸化反应串联,借助后者的不可逆过程打破前者存在的可逆平衡,促进 D-阿洛酮糖的合成,最终偶联体系的转化率可达到 70%。在上述研究的基础上,构建 DPE、RhaB 和 PPK 偶联体系,使得 ATP 得以循环利用,同时减少体系中 ADP 的积累。结果表明,ATP 的用量降低至原来的 1/5,同时最终产物得率为 50%。相比于双酶偶联体系,引入 PPK 酶后,ATP 用量明显减少,反应转化率有所降低,原因可能是由于 PPK 酶的纯度影响了产物的合成。因此,在后期研究中,可考虑换用其他方法对 PPK 进行纯化,以提高其纯度。综上所述,此法显著提高了 D-阿洛酮糖的产率,适用于稀有糖的大规模合成。同时,建立的 DPE、RhaB 和 PPK 三酶偶联体系可应用于全细胞体系中,从而简化整个生产流程,具有实际应用意义。

- [7] ZHANG W, FANG D, ZHANG T, et al. Characterization of a metal-dependent D-psicose 3-epimerase from a novel strain, *Desmospora* sp.8437[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013, 61: 11468-11476.
- [8] IIDA T, HAYASHI N, YAMADA T, et al. Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans[J]. **Metabolism—Clinical and Experimental**, 2010, 59(2): 206-214.
- [9] NAGATA Y, KANASAKI A, TAMARU S, et al. D-psicose, an epimer of D-fructose, favorably alters lipid metabolism in sprague dawley rats[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63: 3168-3176.
- [10] TATSUHIRO M, KEN I. Effects of dietary D-psicose on diurnal variation in plasma glucose and insulin concentrations of rats[J]. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, 2006, 70(9): 2081-2085.
- [11] MATSUO T, BABA Y, HASHIGUCHI M, et al. Dietary D-psicose, a C-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats[J]. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 2015, 10(3): 233-237.
- [12] OCHIAI M, ONISHI K, YAMADA T, et al. D-psicose increases energy expenditure and decreases body fat accumulation in rats fed a high-sucrose diet[J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2014, 65(2): 245-250.
- [13] HOUGH L, STACEY B E. Variation in the allitol content of itea plants during photosynthesis[J]. **Phytochemistry**, 1966, 5(1): 171-175.
- [14] MILLER B S, SWAIN T. Chromatographic analyses of the free amino - acids, organic acids and sugars in wheat plant extracts[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2010, 11(6): 344-348.
- [15] 沐万孟, 张涛, 江波, 等. D-塔格糖 3-差向异构酶家族蛋白的研究进展[J]. **食品与发酵工业**, 2007, 33(9): 127-131.
- [16] GRANSTROM T B, TAKATA G, TOKUDA M, et al. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2004, 97(2): 89-94.
- [17] 张龙涛, 江波, 沐万孟. 新型甜味剂 D-阿洛酮糖研究进展[J]. **食品与发酵工业**, 2008, 34(12): 125-129.
- [18] MU W M, CHU F F, XING Q C, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011, 59(14): 7785-7792.
- [19] GRUENINGER D, SCHULZ G E. Structure and reaction mechanism of L-rhamnulose kinase[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2006, 359: 787-797.
- [20] WEN L Q, HUANG K, LIU Y P, et al. Facile enzymatic synthesis of ketoses[J]. **Angewandte Chemie**, 2015, 54(43): 12654-12658.
- [21] BADIA J, BALDOMA L, AGUILAR J, et al. Identification of the *rhaA*, *rhaB* and *rhaD* gene products from *Escherichia coli* K-12 [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2010, 65(3): 253-257.
- [22] AKIYAMA M, CROOKE E, KORNBERG A. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli* isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1992, 267(31): 22556-22561.
- [23] ZHANG H, ISHIGE K, KORNBERG A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria[J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2002, 99(26): 16678-16683.
- [24] JAE E K, ZHANG Y H. Biosynthesis of D-xylulose 5-phosphate from D-xylose and polyphosphate through a minimized two-enzyme cascade[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2016, 113(2): 275-282.
- [25] WEN L, HUANG K, LIU Y, et al. Facile enzymatic synthesis of phosphorylated ketopentoses[J]. **ACS Catalysis**, 2016, 6(3): 1649-1654.