D-来苏糖异构酶的酶学性质研究

黄嘉苇[1,2]，施 悦[1,2]，张文立[*1,2]，张 涛[1,2]，江 波[1,2]，沐万孟[1,2]
（1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 协同创新中心，江苏 无锡 214122）

摘要：为探索 D-甘露糖的高效酶法合成途径，作者克隆了来源于 *Peptococcaceae bacterium* 1109 的 D-来苏糖异构酶基因，将其导入到 *E. coli* BL21(DE3)中进行表达。该酶的最适底物为 D-来苏糖，并可以高效催化 D-果糖与 D-甘露糖之间的差向异构反应。以 D-果糖为底物时，重组表达的 D-来苏糖异构酶的比酶活可达 2.5 U/mg，该酶的最适 pH 为 7.5，最适温度为 70 ℃，Co^{2+}可以显著提高该酶的活力。在最适条件下以 500 g/L 的果糖为底物，反应 8 h 达到平衡，平衡转化率达 19.17%，生产 D-甘露糖 95.85 g/L。

关键词：D-甘露糖；D-来苏糖异构酶；生物制备
中图分类号：Q 814　　**文献标志码**：A　　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.013

Characterization of Recombinant D-Lyxose Isomerase

HUANG Jiawei[1,2]，*SHI Yue*[1,2]，*ZHANG Wenli*[*1,2]，*ZHANG Tao*[1,2]，*JIANG Bo*[1,2]，*MU Wanmeng*[1,2]
（1. State Key Laboratory of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Collaborative Innovation Center，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：In this study，the D-lyxose isomerase gene derived from *Peptococcaceae bacterium* 1109 was cloned and introduced into *E. coli* BL21 (DE3) for expression. The optimal substrate for the recombinant D-LI is D-lyxose，and it can efficiently catalyze the epimerization reaction between D-fructose and D-mannose. The specific activity of recombinantly expressed D-lysose isomerase can reach 2.544 U/mg when used D-fructose as substrate. It displayed maximal activity in presence of 1 mM Co^{2+} at pH 7.0 and 70 ℃. Under optimum conditions，95.85 g/L D-mannose was produced from 500 g/L D-fructose after reaction for 5 h，giving a conversion yield of 19.17%.

Keywords：D-mannose，D-lyxose isomerase，biological production

近年来，D-甘露糖的制备成为研究热点。目前，主要通过提取、化学合成和生物手段制备 D-甘露糖，提取是目前应用较多的方法，但该方法易受到原料的季节影响[1-16]。化学法可将 D-葡萄糖直接转化为 D-甘露糖，但这一过程需要化学催化剂，并必须严格控制温度和酸浓度[17]。利用生物法进行单糖之间的转化生产 D-甘露糖具有催化效率高、反应条件温和且成本低等优点。目前，甘露糖的生物法

收稿日期：2018-11-01
基金项目：江南大学食品科学与技术国家重点实验室自主研究课题(SKLF-ZZA-201802；SKLF-ZZB-201814)；国家食品科学与工程一流学科建设项目(JUFSTR20180203)；2018 年江苏省研究生科研创新计划项目(KYCX18_1784)。
* **通信作者**：张文立(1989—)，男，博士，助理研究员，主要从事食品生物技术研究。E-mail：wenlizhang@jiangnan.edu.cn
引用本文：黄嘉苇，施悦，张文立，等. D-来苏糖异构酶的酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(01)：83-92.

制备主要以 D-葡萄糖或 D-果糖为原料,利用单糖异构或差向异构来实现。D-来苏糖异构酶 (D-LI, EC 5.3.1.15)、D-甘露糖异构酶(EC 5.3.1.7)和纤维二糖差向异构酶(EC 5.1.3.11)都已被报道具备 D-甘露糖生产能力。但是,目前鉴定的 D-甘露糖异构酶大多催化效率不高,反应温度也较低。纤维二糖差向异构酶是目前已报道唯一可以催化葡萄糖差向异构化生成甘露糖的酶,但该酶的转化率较低,同时会生成大量 D-果糖为副产物[18]。

D-来苏糖异构酶是一种醛酮糖异构酶,可以有效催化 D-木酮糖和 D-来苏糖以及 D-果糖和 D-甘露糖之间的差向异构反应[19]。因其较宽的底物特异性,利用 D-LI 生产 D-甘露糖也受到了研究者的关注。目前,已有 9 种来自不同微生物的 D-LI 被报道。1956 年,Anderson and Allison 首次报道了来自 *Aerobacter aerogenes* PRL-R3 的 D-LI[20],该酶具有催化 D-来苏糖和 D-甘露糖的能力。在这之后,其他来源的 D-LI 陆续被鉴定,分别来源于 *Cohnella laevoribosii* RI-39[21]、*Providencia stuartii* KCTC 2568[22]、*Serratia proteamaculans* KCTC 2936[23]、*Escherichia coli* O157:H7 [24]、*Bacillus subtilis* 168 [25]、*Bacillus licheniformis* DSM13 [26]、*Dictyoglomus turgidum* DSM 6724 [27] 和 *Thermosediminibacter oceani* DSM 16646 [28]。目前,大部分研究主要集中于挖掘 D-LI 的新的微生物来源及改进其对 D-来苏糖的催化效率,而利用 D-LI 生物生产 D-甘露糖的研究相对较少,仅有来自于 *P. stuartii* KCTC 2568[22],*S. proteamaculans* KCTC 2936[23]和 *T.oceani* DSM 16646[28]的 D-LI 被研究用于催化 D-果糖生物转化 D-甘露糖。

Peptococcaceae bacterium 1109 是从牛粪中发现的一种嗜热细菌,Town JR 等已经将 *P. bacterium* 1109 的全基因组序列解析公布在 GenBank 上,登录号为 LDJB01000001.1。该微生物的全基因组中存在可能编码 D-LI 的推定基因,登陆号为:KLU40859.1,含有 180 个氨基酸[29]。作者克隆了来源于 *P. bacterium* 1109 的 D-LI 推定基因,将其导入到大肠杆菌表达系统中进行表达,对重组酶进行分离纯化操作,研究了其酶学性质以及从 D-果糖生物转化 D-甘露糖,为酶法工业化生产 D-甘露糖奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

E. coli BL21(DE3)、*E. coli* DH5α:作者所在实验室保藏。

1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L):酵母提取物 5,氯化钠 10,胰蛋白胨 10,氨苄霉素的终质量浓度为 50 μg/mL。

LB 固体培养基(g/L):酵母提取物 5,氯化钠 10,胰蛋白胨 10,琼脂添加量为质量分数 1.8%,氨苄霉素的终质量浓度为 100 μg/mL。

1.3 主要试剂与材料

酵母提取物、胰蛋白胨、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和标准蛋白 marker,牛血清蛋白标准品(BSA):购自上海生工生物工程有限公司;D-果糖、D-甘露糖、D-来苏糖、D-木酮糖、L-核糖、L-核酮糖:购自 Sigma-Aldrich 公司;其他化学试剂为分析纯。

1.4 仪器与设备

蛋白电泳系统、凝胶成像系统:美国 Bio-Rad 公司产品;高速冷冻离心机:德国 Eppendorf 公司产品;高效液相色谱(HPLC)系统:美国 Waters 公司产品;Carbomix Ca-NP10 色谱柱:美国赛分科技公司产品;TSKgel G3000 SWXL 凝胶色谱柱:默隆(上海)实业有限公司产品。

1.5 实验方法

1.5.1 重组 D-LI 的基因克隆及诱导表达 *P. bacterium* 1109 是一种耐热型微生物,克隆其 D-LI 基因(GenBank 登录号为 LDJB01000001.1,编码氨基酸序列登录号为 ADL08607.1)。在 5'端和 3'端分别引入酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I,至载体 pET-22b(+)上,获得重组质粒 pET-Peba-D-LI 转化至大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)中表达。在基因序列的 C'末端融合 6 个组氨酸标签,以便于重组蛋白纯化。

1.5.2 重组 D-LI 的纯化分离 挑取构建成功的重组菌的单菌落接种到 4 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中,于 37 ℃摇床 250 r/min 过夜培养,将种子培养液以体积分数 2%接种量接种至 200 mL LB 液体培养基中,37 ℃、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值达到 0.6~0.8,添加 IPTG 诱导剂至终浓度 1 mmol/L,28 ℃、200 r/min 低温诱导培养 6 h。收集诱导表达完成的菌体,用裂解液洗涤重悬超声破碎后的菌

体,将重悬液在4 ℃、8 000 r/min的条件下离心15 min,0.45 μm滤膜过滤上清液,使用螯合Ni^{2+}的填充层析柱进行酶纯化操作。

在低温条件下,用5个柱体积的去离子水冲洗Ni^{2+}填充层析柱;再用3~4个柱体积的Binding Buffer(500 mmol/L NaCl,50 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.0)平衡Ni^{2+}层析柱;随即将粗酶液加入层析柱中,粗酶液缓缓流经Ni^{2+}层析柱,使目的蛋白与Ni^{2+}层析柱充分结合;然后用5个柱体积的Wash Buffer(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L咪唑,50 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.0)洗脱杂蛋白;最后用5个柱体积的Elution Buffer(500 mmol/L NaCl,500 mmol/L咪唑,50 mmol/L磷酸盐缓冲液,pH 7.0)洗脱目的蛋白。使用含EDTA的磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L EDTA,50 mmol/L,pH 7.5)透析6 h,螯合去除酶液中的金属离子;之后用不含EDTA的磷酸盐缓冲溶液(50 mmol/L,pH 7.5)透析两次,每次6 h,除去残存的EDTA,得到纯酶液。

1.5.3 重组D-LI的相对分子质量测定 利用丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测重组蛋白质单亚基相对分子质量,电泳的分离胶和浓缩胶丙烯酰胺质量浓度分别为12 g/dL和5 g/dL,考马斯亮蓝R250作为蛋白显色剂。

利用配备了紫外检测器和TSKgel G2000SWxl凝胶色谱柱的高效液相系统检测重组酶的全相对分子质量。HPLC条件为:流动相:100 mmol/L KH_2PO_4,100 mmol/L Na_2HPO_4,质量分数0.05% NaN_3,100 mmol/L Na_2SO_4,pH 6.8;流量:1 mL/min。柱温:23 ℃;检测器条件:UV 280 nm。

1.5.4 重组D-LI的酶活测定 D-甘露糖转化的酶反应体系为1 mL,D-果糖10 mmol/L,$CoCl_2$ 1 mmol/L,磷酸盐缓冲液(pH 7.5)50 mmol/L,重组酶0.1 U/mL。在70 ℃条件下反应10 min,煮沸10 min终止酶反应。

D-甘露糖检测:将反应结束后的产物离心(4 ℃,12 000 r/min,30 min),使用0.22 μm微滤膜过滤上清液,稀释后使用HPLC进行检测。检测条件:Waters 2695型高效液相色谱仪,Waters示差折光检测器(RI),Carbomix Ca-NP10色谱柱(10 μm,D7.8 mm×300 mm),0.22 μm滤膜过滤后的超纯水作为流动相,柱温85 ℃,流量0.6 mL/min。

酶活单位U定义:pH 7.5、70 ℃的条件下,单位时间内酶催化D-果糖产生1 μmol的D-甘露糖所需要的加酶量定义为一个酶活单位。

1.5.5 重组D-LI的最适温度和热稳定性测定 将1 mL的酶反应体系分别置于不同温度(45~85 ℃)条件下参照1.5.4方法测定各反应温度下的相对酶活,确定最适反应温度,将酶活最高的一组设为相对酶活100%。

将纯化后的酶液分别在70~80 ℃的条件下保温,每隔30 min间隔取样,并立即在标准条件下测定活性。定义初始酶活为相对酶活100%。

为研究重组酶的结构稳定性,使用TA Nano-DSC测定该重组酶Tm值。以酶的透析液作为空白基线,将DSC仪器平衡300 s。从30 ℃加热至110 ℃,升温速率为1 ℃/min。使用Nano Analyze软件对DSC数据进行校正分析,并计算重组酶的T_m值。

1.5.6 重组D-LI的最适pH 将1 mL的酶反应体系分别置于不同pH(pH 4.5~9.0)条件下测定各反应pH下的相对酶活,确定最适反应pH,并将酶活最高的一组设为相对酶活100%。实验中用到3种不同的缓冲体系:醋酸盐缓冲液(pH 4.5~6.0);磷酸盐缓冲液(pH 6.0~7.5);Tris-HCl缓冲液(pH 7.5~9.0)。

1.5.7 金属离子对重组D-LI酶活的影响 在1 mL的酶反应体系添加1 mmol/L不同种类的二价金属离子(Co^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+}、Cu^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Zn^{2+}、Ba^{2+}),测定不同种类的金属离子对酶催化反应的影响,确定酶反应的最适离子,并将酶活最高的一组设为相对酶活100%。

1.5.8 重组D-LI动力学参数的测定 研究重组酶的底物特异性和反应动力学,分别以5~200 mmol/L的D-果糖、D-甘露糖、D-来苏糖、L-核糖作为底物,在最适条件下进行酶反应,测定酶活。通过Lineweaver-Burk双倒数法作图,并计算出重组酶的动力学参数:米氏常数K_m值、催化常数k_{cat}值和催化效率k_{cat}/K_m值。

1.5.9 重组D-LI平衡转化率的测定 为测定D-果糖和D-甘露糖的反应平衡转化率,以10 mmol/L的D-果糖为底物,加入1 mmol/L Co^{2+}和0.3 U/mL重组酶,在45~85 ℃的条件下,反应48 h,测定D-甘露糖转化率。

1.5.10 D-甘露糖的大规模生物转化 为研究D-果糖和D-甘露糖之间的大规模生物转化,分别以100、300、500 g/L的高质量浓度D-果糖溶液为底物

进行长时间生物转化。加入 1 mmol/L Co^{2+}和 0.3 U/mL 重组酶,在 70 ℃,pH 7.5 条件下反应,测定重组酶的催化反应进程。间隔时间取样灭活,检测其中 D-甘露糖生成量。

2 结果与讨论

2.1 重组 D-LI 的质粒构建与表达

2.1.1 重组 D-LI 的重组质粒构建 *P. bacterium* 1109 微生物的全基因组序列已在 NCBI 中公布,登录号为:LDJB01000001.1,经预测该微生物存在基因片段能够编码 D- LI,基因片段 KLU40859 全长 543 bp,可编码 180 个氨基酸,理论相对分子质量为 20.35×10^3。在该基因片段上下游引物 5'端分别引入 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,由上海捷瑞生物工程有限公司合成后连接到 pET-22b(+)表达载体(图 1),获得重组质粒 pET22b-peba-D-LI。为了简化重组蛋白的纯化步骤,在重组质粒 C-端添加了 6×his-tag 标签。

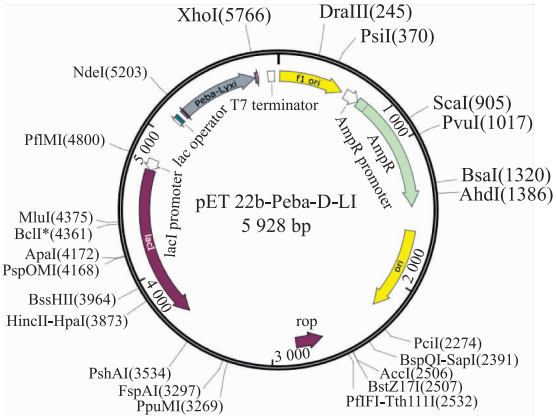


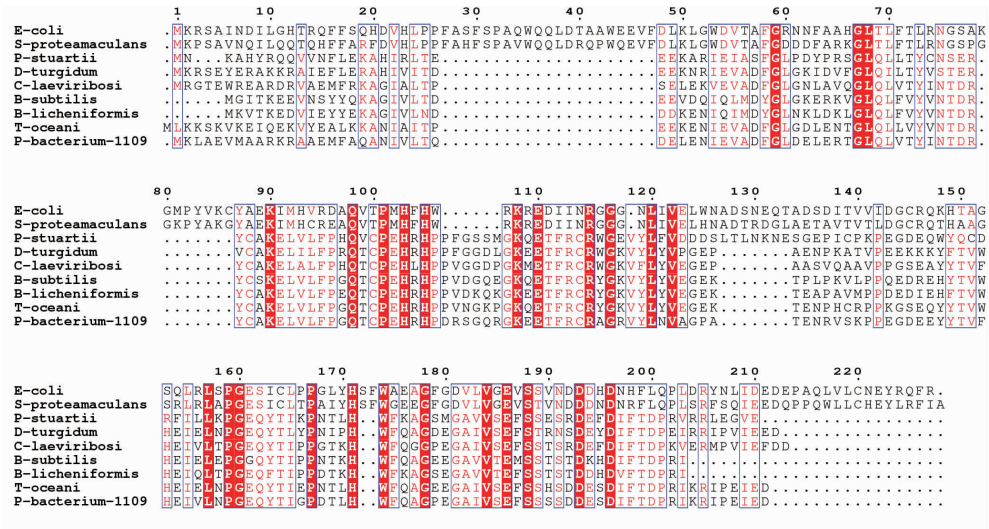
图 1 重组 D-LI 质粒构建

Fig. 1 Constructed recombinant plasmid of D-LI

2.1.2 重组 D-LI 的氨基酸序列分析 通过 Espript 软件(http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/),将来源于 *P. bacterium* 1109 的 D-LI 的氨基酸序列与已经报道的其他 8 种 D-LI 的氨基酸序列进行序列比对(图 2)。高亮红色表示氨基酸残基 100%相同;蓝色方框中字体红色表示 75%以上的氨基酸残基相同;空白表示氨基酸残基完全不同。结合已报道的来源于 *B. sutbilis* 的 D-LI 晶体结构可以看出,所有已鉴定的 D-LI 在关键位点上的氨基酸残基上具有严格的保守或较高的相似度。例如,二价金属离子调节位点上(103、105、171 位的 3 个 His 和 110 位的 Glu);与 D-果糖和离子结合相关的 6 个氨基酸残基(K90,K108,E110,E186,D193,N917 和 R205),除了与 D-果糖的 O-2 结合相关的N917,其余氨基酸残基均为严格保守,同时,在 917 位点上,除了 *S. proteamaculans* KCTC 2936 [23],*E.coli* O157:H7[24],*B. licheniformis* DSM13[26],其余报道的 D-LI 的该位点上氨基酸都是 Ile。而通过氢键与 D-果糖的 O-4 结合的 203 与 208 位点处的氨基酸残基并不保守,可能是造成不同的酶对底物特异性识别和亲和力大小不同的原因。

2.1.3 重组 D-LI 在 *E.coli* BL21 (DE3) 中的表达 将来源于 *P.bacterium* 1109 的 D-LI 按照 1.5.2 方法进行诱导表达,重组质粒 C-端末尾引入的 6×his-tag 标签可以高度亲和 Ni^{2+},使用 Ni^{2+}-Chelating Sepharose Fast Flow 亲和色谱快速纯化目的蛋白。将诱导纯化后的重组蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳检测(图 3)。分析结果显示,全细胞及纯酶样品在 21×10^3 处出现明显的目的条带,与重组蛋白的理论相对分子质量 20.78×10^3 结果相一致。随着诱导时间的延长,该处的条带逐渐加宽,纯化后的酶液电泳条带单一,纯度达到电泳纯。证明该 D-LI 目的基因的大肠杆菌基因工程菌成功构建,并且诱导表达。

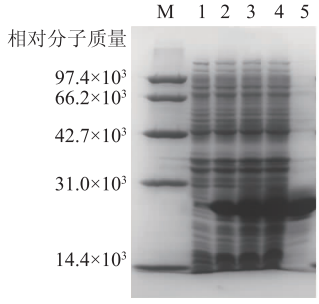
2.1.4 重组 D-LI 的全相对分子质量测定 使用 TSKgel G2000SWxl 凝胶色谱柱,利用紫外检测器测定来自 *P.bacterium* 1109 的 D-LI 的蛋白全相对分子质量。绘制蛋白全相对分子质量标准曲线(图 4),参照标准曲线得出该重组酶的相对分子质量大约为 42×10^3,SDS-PAGE 结果显示该酶的单亚基相对分子质量为 21×10^3,因此,该酶为二聚体结构。目前已经被鉴定的来源于 *C. laevoribosii* RI-39[21]、*P. stuartii* KCTC 2568[22]、*S. proteamaculans* KCTC 2936[23]、*E.coli* O157:H7[24]、*D. turgidum* DSM 6724[27]以及 *T. oceani* DSM 16646[28]的 D-LI 均为二聚体结构,其中,来源于 *P. stuartii* KCTC 2568 [22],*D. turgidum* DSM 6724[27]及 *T. oceani* DSM 16646[28]的酶相对分子质量与本实验的重组酶相近,为 44×10^3。



注：*E. coli* O157:H7（Q8×5Q7，228 个氨基酸）；*S. proteamaculans* KCTC 2936（GenBank:BAJ07463.1，228 个氨基酸）；*P. stuartii* KCTC 2568（GenBank:EDU58657，183 个氨基酸）；*D. turgidum* DSM 6724（GenBank:YP 002352606.1，181 个氨基酸）；*C. laevoribosii* RI-39（GenBank:ABI93960.1，182 个氨基酸）；*B. subtilis* 168（GenBank:AIY91703，167 个氨基酸）；*B. licheniformis* DSM13（GenBank:AAU22106.1，167 个氨基酸）；*T. oceani* DSM 16646（GenBank:CP002131.1，181 个氨基酸）；*P. bacterium* 1109（GenBank:LDJB01000001.1，180 个氨基酸）。

图 2　D-LI 的氨基酸序列比对

Fig. 2　Multiple sequence alignment of amino acids from D-LI



注：M：蛋白 marker（97.4×10³，66.2×10³，42.7×10³，31.0×10³，14.4×10³）；1：未加 IPTG 诱导的全细胞；2-4：加入 IPTG 诱导 2、4、6 h 的全细胞；5：纯化后的重组 D-来苏糖异构酶。

图 3 纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3　SDS -PAGE analysis of the purified recombinant protein

2.2　重组 D-LI 的酶学性质鉴定

2.2.1　*重组 D-LI 的最适温度及温度稳定性*　温度是影响酶催化效率的重要条件之一。较高的温度有利于增强化学反应速率，但温度升高的同时，也会加速酶蛋白的变性，降低酶的催化效率[30-31]。通过测定 45~85 ℃的酶活力，得到该酶随着温度变化的酶活力曲线（图 5）。可以看出，在 45~70 ℃，该酶的活力随着温度的升高而增加。温度达到 70 ℃时，酶的活力最高。并且在 60~70 ℃时，重组酶有较高的催化效率。当温度超过 70 ℃时，重组酶的活力急剧下降，80 ℃时酶活仅为保留最高酶活的 20%。

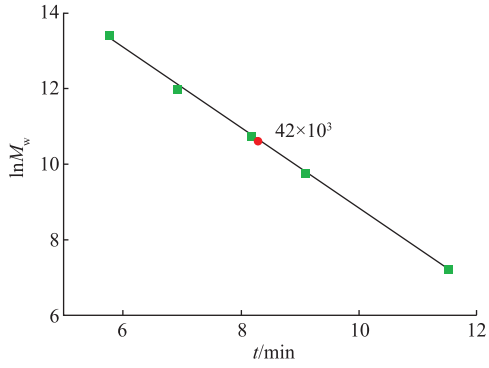


图 4　D-LI 全相对分子质量测定

Fig. 4　Determination of total molecular weight of D-LI

将纯酶溶液在 70、75、80 ℃条件下保温，定时取样观察酶的活力损失情况。定义初始酶活为 100%，采用一级动力学模型，将不同时间酶的相对酶活作图（图 6）。可以看出，该酶在 70 ℃和 75 ℃条件下比较稳定，70 ℃条件下保温 2 h，仍能保持 84% 的酶活，75 ℃保温 1.5 h，酶活为 81%。当在 80 ℃保温时，酶活损失较快，保温 1.5 h 后，酶活下降至约 50%。在 70、75、80 °℃下，酶的衰减常数分别为 0.1040、0.1258、0.4309，相应的半衰期分别为 6.66、

5.51、1.61 h。通过 TA Nano-DSC 测得该重组酶的 Tm 值为 67.20 ℃(图 7),说明该重组酶蛋白的热稳定性较高。

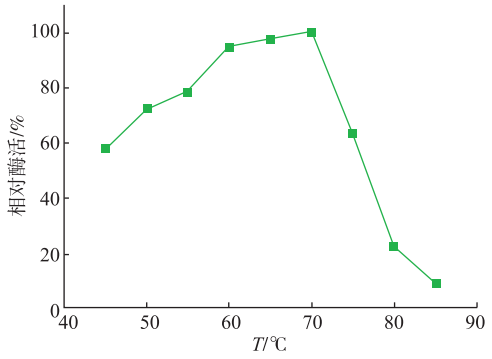


图 5 温度对重组 D-LI 催化活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the enzyme activity of the recombinant D-LI

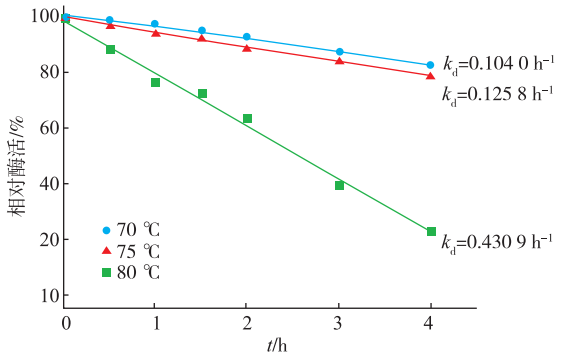


图 6 重组 D-LI 的热稳定性

Fig. 6 Effect of temperature on the thermostability of the recombinant D-LI

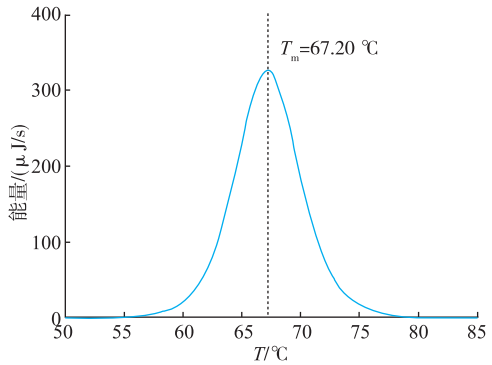


图 7 重组 D-LI 的 DSC 分析

Fig. 7 DSC analysis of the recombinant D-LI

目前已报道的 D-LI 的最适温度大多在 40 至 75 ℃之间,来源于 *D. turgidum* DSM 6724[27]的 D-LI 最适温度为 75 ℃,是目前最适反应温度最高的D-LI。尽管来源于 *P. bacterium* 1109 的最适温度略低于 *D. turgidum* DSM 6724,但是相对而言有较好的热稳定性,在 70、75、80 ℃的条件下半衰期为 6.66、5.51 和 1.61 h,而来源于 *D. turgidum* DSM 6724 的 D-LI 在这几个温度条件下半衰期分别为2.8、1.8 和 0.8 h。此外,除了 *C. laevoribosii* RI-39[21],*D. turgidum* DSM 6724[27]以及 *T. oceani* DSM 16646[28]是来源于耐热微生物,其他报道的 D-LI 都来源于嗜温微生物。在醛酮糖异构酶的工业化应用中,来源于耐热微生物的酶往往具有更高的热稳定性,也更适合应用于工业生产。综合比较已报道的 D-LI,本研究鉴定的 D-LI 具有较高的最适反应温度和较强的热稳定性,具有一定工业应用价值。

2.2.2 重组 D-LI 的最适 pH 酶的活性易受到体系 pH 的影响。酶在不同的pH 条件下活性会有所不同,不同的酶的有各自的最适 pH。通过测定 pH 4.5 至 9.0 的 pH 值缓冲环境下重组 D-LI 酶活的变化(图 8),发现该酶的最适pH 条件为 pH 7.5 的磷酸盐缓冲体系。pH 在 4.5 至5.5 之间时,相对酶活较低,随着酸性的增强,酶活急剧下降,可见该酶在酸性条件下时较为敏感。pH 大于 7.5 时,酶活相对稳定,随着碱性增强,酶活损失较慢,说明该重组酶在中性及弱碱性环境下较为稳定。

综合比较目前已报道的 D-LI 可以发现,大部分酶的最适 pH 为中性偏碱性,而来源于 *C. laevoribosii* RI-39[21]和 *T. oceani* DSM 16646[28]最适 pH 为 6.5。在糖酶的催化反应中,弱酸性环境有利于抑制碳水化合物的美拉德反应,减少非酶褐变和副产物的产生,有利于工业化生产[32-33]。

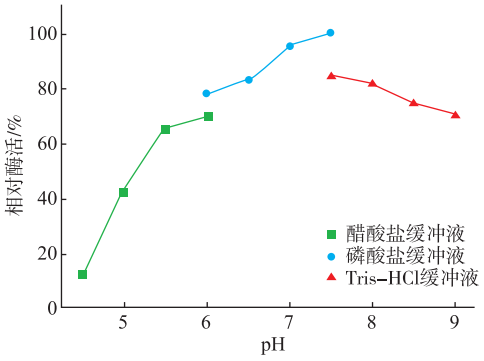


图 8 pH 对重组 D-LI 催化活性的影响

Fig. 8 Effect of pH on the enzyme activity of the recombinant D-LI

2.2.3 重组 D-LI 的最适金属离子 金属离子可以作为辅助因子或激活剂,在酶反应中起着十分重要

的作用。在单糖异构酶中，金属离子往往对酶活有十分重要的影响。作者研究了不同二价金属离子对重组 D-LI 酶活的影响(表 1)。以纯化后经 EDTA 处理的原始酶作为对照组，可以看出，金属离子对酶反应有比较大的影响。其中，Co^{2+}可以将酶活提高为对照组的 170 倍以上。Mn^{2+}、Ca^{2+}、Ba^{2+}以及 Mg^{2+}也对酶反应有一定促进作用。添加 Mn^{2+}时的酶活达到未添加时的 143%，添加 Ca^{2+}时的酶活达到未添加时的 127%，添加 Ba^{2+}时的酶活达到未添加时的 147%，添加 Mg^{2+}时的酶活达到未添加时的 123%。另外几种离子 Ni^{2+}、Fe^{2+}和 Zn^{2+}的添加会抑制酶活，添加 Cu^{2+}后几乎没有酶活。

表 1　金属离子对 D-LI 活性的影响

Table 1　Effect of metal ions on the enzyme activity of D-LI

金属离子(1 mmol/L)	相对酶活/%
Control	100
Co^{2+}	175.81±2.49
Mn^{2+}	143.27±4.79
Ni^{2+}	77.74±2.18
Ca^{2+}	126.89±3.57
Fe^{2+}	37.46±0.32
Ba^{2+}	147.20±1.06
Zn^{2+}	47.39±1.82
Mg^{2+}	122.52±7.06
Cu^{2+}	0

目前鉴定的 D-LI 中，除了来源于 *D. turgidum* DSM 6724[27]的 D-LI 最适金属离子也是 Co^{2+}，其他所有被报道的 D-LI 的最适金属离子都是 Mn^{2+}。大部分 D-LI 可以被 Mn^{2+}或 Co^{2+}激活，但是来源于 *C. laevoribosii* RI-39[21]和 *P. stuartii* KCTC 2568[22]的 D-LI 活性却会被 Co^{2+}抑制。离子在许多单糖异构酶的催化作用中起着十分重要的作用，如 L-阿拉伯糖异构酶[34]，酮糖 3-差向异构酶[35]，L-鼠李糖异构酶[36]和 D-葡萄糖异构酶[37]。此外，金属离子与一些糖酶的稳定性有关。例如，添加金属离子可以改善 D-阿洛酮糖 3-差向异构体和 L-鼠李糖异构酶的热稳定性和结构稳定性[38-39]。

2.2.4　重组 D-LI 的动力学参数研究　分别以 5-200 mmol/L D-来苏糖、D-甘露糖、D-果糖、D-核糖为底物，研究重组 D-LI 的底物特异性(表 2)。在最适条件下进行酶反应，反应后通过 HPLC 测定酶活性。通过 Lineweaver-Burk 双倒数法作图，计算重组 D-LI 的米氏常数 K_m 值、催化常数k_{cat} 值和催化效率 k_{cat}/K_m 值。通过 K_m 值，可以直观看出酶与底物亲和力的大小，K_m 值越大代表酶与底物的亲和力越校；kcat 代表酶的催化速率，k_{cat} 值越大，代表酶催化速率越高；k_{cat}/K_m 则代表酶反应的催化效率，k_{cat}/K_m 值越大，则酶的催化效率越高[40]。结果显示，该重组酶的最适底物是 D-来苏糖，比酶活可以达到为(7.755±0.3) U/mg。以 D-甘露糖为底物时，比酶活为 (5.424±0.1) U/mg，D-果糖为底物时，比酶活为(2.544±0.2) U/mg，以 L-核糖为底物时，比酶活为(1.848±0.1) U/mg。

表 2　来源于 *P. bacterium* 1109 的 D-LI 比酶活与动力学参数

Table 2　Specific activities and kinetic parameters of D-LI from *P. bacterium* 1109

底物	产物	比酶活/(U/mg)	K_m/(mmol/L)	k_{cat}/(1/min)	k_{cat}/K_m
D-来苏糖	D-木酮糖	7.755	51.036	2 166.047	42.441
D-甘露糖	D-果糖	5.424	33.467	339.301	10.138
D-果糖	D-甘露糖	2.544	21.092	155.088	7.353
L-核糖	L-核酮糖	1.848	1 130.088	4 100.054	3.628

以 D-来苏糖为底物时，K_m 值和 k_{cat}/K_m 值分别为 12.868 mmol/L、58.032 L/(mmol min)；以 D-甘露糖为底物时，K_m 值和 k_{cat}/K_m 值分别为 33.467 mmol/L、10.138 L/(mmol·min)。以 D-果糖为底物时，K_m 值和 k_{cat}/K_m 值分别为 21.092 mmol/L、7.353 L/(mmol·min)；以 L-核糖为底物时，K_m 值和 k_{cat}/K_m 值分别为 1 130.088 mmol/L、3.628 L/(mmol·min)。可以看出，该重组酶对 D-来苏糖、D-甘露糖、D-果糖和 L-核糖都有催化活性，且相对活性依次降低；该重组酶对 D-来苏糖的 K_m 值最小，说明与 D-来苏糖的亲和力最强；同时 k_{cat}/K_m 值较大，说明 D-来苏糖有较高的催化效率，最适底物为来苏糖，为 D-LI。对比其他几种已报道的 D-LI 的动力学参数可以看出，来自 *P. bacterium* 1109 的 D-LI 是目前已报道的对 D-果糖亲和力最强，催化效率最高的酶，这进一步说明了该酶在 D-果糖生物生产 D-甘露糖的工业应用中具有较高的价值。

2.2.5　重组 D-LI 的平衡转化率　为测定 D-果糖和 D-甘露糖的反应平衡转化率，以 10 mmol/L D-果糖为底物，在最适条件下，50~80 ℃酶反应 48 h，测定 D-甘露糖转化率(表 3)。在 40~70 ℃时，该反应的平衡转化率受温度影响不大，在 24.2%至

25.2%之间,并且随着温度的升高,甘露糖的转化率逐渐变小,平衡朝向果糖转移。而反应温度高于 70 ℃时,甘露糖的转化率很快降到 10%左右,这可能是由于该酶在 70 ℃以上时迅速失活,同时反应平衡也随着温度的升高进一步向果糖移动。目前已报道的 D-LI 大部分平衡转化率在 20%左右,除了来源于 *B. licheniformis* DSM13 [26] 的转化率较高,为 30%,来源于 *P. stuartii* KCTC 2568[22]的转化率与该酶相近,都是 25%。

表 3 不同温度下 D-甘露糖的平衡转化率

Table 3 Transformation ratio of D-mannose at different temperatures

T/℃	*m*(D-果糖:*m*(D-甘露糖)
50	76:24
55	75:25
60	75:25
65	80:20
70	86:14
75	96:04
80	98:02

2.2.6 D-甘露糖的大规模生物转化 为研究 D-果糖和 D-甘露糖的底物转化情况,分别以 100、300、500 g/L 的 D-果糖为底物,在最适条件下,进行长时间生物转化,每隔一定时间取样灭活,稀释后检测 D-甘露糖生成量(图 9)。以 100 g/L 的 D-果糖为底物时,反应 3 h 平衡时 D-甘露糖的转化率为 23.81%,D-甘露糖质量浓度为 23.81 g/L。以 300 g/L 的 D-果糖为底物时,反应 5 h 达到平衡状态,D-甘露糖反应平衡时生成率为 22.35%,D-甘露糖质量浓度为 67.05 g/L。以 500 g/L 的果糖为底物时,反应 8 h 后达到平衡状态,平衡时甘露糖的产率为 19.17%,甘露糖质量浓度为 96.85 g/L。底物质量浓度的增加可以促进反应平衡向右移动,得到更多的产物,但当反应达到平衡之后,产物的抑制作用会使转化率轻微降低。

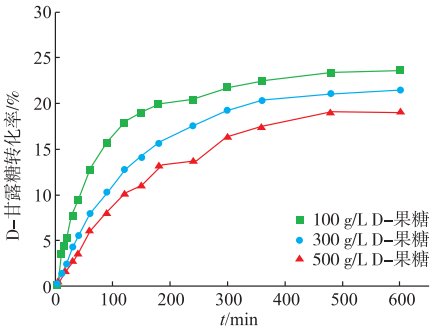


图 9 D-甘露糖的生物转化

Fig. 9 D-Mannose production from D-fructose by D-LI

3 结 语

作者鉴定了一株来源于耐热微生物 *P. bacterium* 1109 的 D-LI,并将其应用于 D-甘露糖的生物法合成。通过合成该 D-LI 的编码基因,将其连接到质粒 pET-22b(+)载体上,并转化至表达宿主大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中,实现了该酶在大肠杆菌中的外源表达。对目的蛋白进行分离纯化后研究了该酶的酶学性质,以 D-果糖为底物时,重组表达的 D-LI 的比酶活可达 1.2 U/mg。该重组 D-LI 的最适 pH 为 7.5,最适温度为 70 ℃。该重组酶在中性及弱碱性环境下和 70~75 ℃的温度下有较好的热稳定性,70 和 75 ℃的半衰期分别为 6.66、5.51 h。Co^{2+}可以显著提高该酶的活力。研究其底物特异性发现,该 D-LI 的最适底物为 D-来苏糖,但是对 D-果糖也有较高的亲和力和相对较高的催化效率。在最适条件下以 500 g/L 的果糖为底物,反应 8 h 达到平衡,平衡转化率达 19.17%。

参考文献:

[1] HU X,SHI Y,ZHANG P,et al. D-Mannose:properties,production,and applications:an overview [J]. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**,2016,15(4):773-785.

[2] TENG B. Preparation of mannose and its functional health effects [J]. **Light Industry Science And Technology**,2014(7):67-8.(in Chinese)

[3] YIN Z,WANG N,JI W. On Preparation of mannose with solvent replacement crystallization method [J]. **Journal of Anhui Agriculture Science**,2013(24):10134-10135.(in Chinese)

[4] WENK C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig[J]. **Animal Feed Science & Technology**,2001,90(2):

21-33.
[5] SHARMA V，ICHIKAWA M，FREEZE H H. Mannose metabolism：more than meets the eye [J]. **Biochemical & Biophysical Research Communications**，2014，453(2)：220-228.
[6] JR W F，JR C G. Mannose utilization in man[J]. **Journal of Clinical Investigation**，1963，42(8)：1300-1312.
[7] PABLO S G，James O，SIMONE C，et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy [J]. **Nature**，doi：10.1038/s41586-018-0729-3.
[8] OYOFO B A，DELOACH J R，CORRIER D E，et al. Prevention of salmonella typhimurium colonization of broilers with D-mannose[J]. **Poultry Science**，1989，68(10)：1357-1360.
[9] CHEN F E，ZHAO J F，XIONG F J，et al. An improved synthesis of a key intermediate for (+)-biotin from D-mannose[J]. **Carbohydrate Research**，2007，342(16)：2461-2464.
[10] EL-NAKKADY S S，HANNA M M，ROAIAH H M，et al. Synthesis，molecular docking study and antitumor activity of novel 2-phenylindole derivatives[J]. **European Journal of Medicinal Chemistry**，2012，47(1)：387-398.
[11] ETCHISON J R，FREEZE H H. Enzymatic assay of D-mannose in serum[J]. **Clinical Chemistry**，1997，43(3)：533-538.
[12] SAHA B C，RACINE F M. Biotechnological production of mannitol and its applications [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2011，89(4)：879-891.
[13] HEINEN A W，PETERS J A，VAN BEKKUM H. Hydrogenation of fructose on Ru/C catalysts [J]. **Carbohydrate Research**，2000，328(4)：449-457.
[14] MAKKEE M，KIEBOOM A P G，VAN BEKKUM H. Production methods of D-mannitol [J]. **Starch–Stärke**，1985，37(4)：136-141.
[15] MISHRA D K，HWANG J-S. Selective hydrogenation of D-mannose to D-mannitol using NiO-modified TiO_2 (NiO-TiO_2) supported ruthenium catalyst[J]. **Applied Catalysis A：General**，2013，453(0)：13-19.
[16] ISHRUD O，ZAHID M，AHMAD V U，et al. Isolation and structure analysis of a glucomannan from the seeds of Libyan dates[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**，2001，49(8)：3772-3774.
[17] 刘彦卿，容文谦，容淑祥，等. 一种 D- 甘露糖制备工艺：CN 101851689 B[P]. 2012.
[18] PARK C S，KIM J E，CHOI J G，et al. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and its application in the production of mannose from glucose [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2011，92(6)：1187-1196.
[19] HUANG J，CHEN Z，ZHANG W，et al. D-lyxose isomerase and its application for functional sugar production [J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**，2018，102(5)：2051-2062.
[20] ANDERSON R L，ALLISON D P. Purification and characterization of D-lyxose isomerase[J]. **Journal of Biological Chemistry**，1965，240(8)：2367-2372.
[21] CHO E A，LEE D W，CHA Y H，et al. Characterization of a Novel D-Lyxose Isomerase from *Cohnella laevoribosii* RI-39 sp. nov [J]. **Journal of Bacteriology**，2007，189(5)：1655-1663.
[22] KWON H-J，YEOM S-J，PARK C-S，et al. Substrate specificity of a recombinant D-lyxose isomerase from *Providencia stuartii* for monosaccharides[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**，2010，110(1)：26-31.
[23] PARK C S，YEOM S J，LIM Y R，et al. Substrate specificity of a recombinant D-lyxose isomerase from *Serratia proteamaculans* that produces D-lyxose and D-mannose[J]. **Letters in Applied Microbiology**，2010，51(3)：343-350.
[24] VAN L S，PARK C S，YEOM S J，et al. Structure-based annotation of a novel sugar isomerase from the pathogenic *E. coli* O157：H7[J]. **Journal of Molecular Biology**，2010，401(5)：866-886.
[25] MARLES-WRIGHT J，LEWIS R J. The structure of a D-lyxose isomerase from the σB regulon of *Bacillus subtilis* [J]. **Proteins：Structure，Function，and Bioinformatics**，2011，79(6)：2015-2019.
[26] PATEL D H，WI S G，LEE S G，et al. Substrate specificity of the *Bacillus licheniformis* lyxose isomerase YdaE and its application in in vitro catalysis for bioproduction of lyxose and glucose by two-step isomerization [J]. **Applied & Environmental Microbiology**，2011，77(10)：3343-33450.
[27] CHOI J-G，HONG S-H，KIM Y-S，et al. Characterization of a recombinant thermostable D-lyxose isomerase from *Dictyoglomus turgidum* that produces D-lyxose from D-xylulose[J]. **Biotechnology Letters**，2012，34(6)：1079-1085.

[28] YU L,ZHANG W,ZHANG T,et al. Efficient biotransformation of D-fructose to D- mannose by a thermostable D-lyxose isomerase from *Thermosediminibacter oceani*[J]. **Process Biochemistry**,2016,51(12):2026-2033.
[29] TOWN J R,DUMONCEAUX T J. Laboratory-scale bioaugmentation relieves acetate accumulation and stimulates methane production in stalled anaerobic digesters[J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2016,100(2):1009-1017.
[30] MOZHAEV V V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization[J]. **Trends in Biotechnology**,1993,11(3):88-95.
[31] ZAMOST B L,NIELSEN H K,STARNES R L. Thermostable enzymes for industrial applications [J]. **Journal of Industrial Microbiology**,1991,8(2):71-81.
[32] SHEN S C,WU J S B. Maillard browning in ethanolic solution[J]. **Journal of Food Science**,2010,69(4):FCT273-FCT9.
[33] FRIEDMAN M. Food browning and its prevention:an overview[J]. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**,1996,44(3):631-653.
[34] XU Z,LI S,FENG X,et al. L-Arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars [J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2014,98(21):8869-8878.
[35] ZHANG W,YU S,ZHANG T,et al. Recent advances in D-allulose:Physiological functionalities,applications,and biological production[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2016,54(1):27-37.
[36] XU W,ZHANG W,ZHANG T,et al. L-Rhamnose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars [J]. **Applied Microbiology & Biotechnology**,2016,100(7):1-8.
[37] BOCK K,MELDAL M,MEYER B,et al. Isomerization of D-glucose with glucose-isomerase. A mechanistic study [J]. **Acta Chemica Scandinavica**,1983,37(2):101-108.
[38] CHEN Z,XU W,ZHANG W,et al. Characterization of a thermostable recombinant L-rhamnose isomerase from *Caldicellulosiruptor obsidiansis* OB47 and its application for the production of L-fructose and L-rhamnulose [J]. **Journal of the Science of Food & Agriculture**,2017,98(6):2184-2193.
[39] ZHANG W,FANG D,XING Q,et al. Correction:characterization of a novel metal-dependent D-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704[J]. **Plos One**,2013,8(4):e62987.
[40] WEN Y,ZHANG T,MU W,et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of D- psicose 3- epimerase [J]. **Journal of Food Science and Technology**,2018(3):289-296.(in Chinese)

会　议　消　息

会议名称:2019 年第十届生物技术与食品科学国际会议(ICBFS 2019)

会议时间: 2019-4- 8　　会议网址:http://www.icbfs.org/

会议地址:西班牙巴塞罗那　　投稿方式:http://confsys.iconf.org/submission/icbfs2019

会议邮箱:icbfs@cbees.org

联系电话:+852-3500-0137 (中国香港)/+1-206-456-6022 (美国)/+86-28-86528465 (中国大陆)

会议专员:黄女士

择优发表的文章可以发表在国际期刊 IJFE 或 IJBBB，能被 Google Scholar、Cross ref、CABI、WorldCat and ProQuset 等数据库检索。

会议邀请到著名的教授作为主讲人，他们是来自丹麦哥本哈根丹麦 Temarks 大学国家食品研究所的 Anders Permin 教授和来自英国兰卡斯特大学兰开斯特环境中心的 Martin A.J. Parry 教授。