DOI:10.12441/spyswjs.20230211003 [文章编号] 1673-1689(2024)11-0106-09

石油热袍菌来源的塔格糖4-差向异构酶在大肠杆菌中的重组表达及全细胞固定化研究

郭雪红[1,2,3,4] 刘展志[1,2,3,4] 许 滢[1,2,3,4] 吴 敬[1,2,3,4*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122; 4. 江南大学教育部食品安全国际合作联合实验室,江苏 无锡 214122)

摘要: *D*-塔格糖是一种具有多种生理功能的稀少糖,但其现有生物制备方法存在底物成本高、供应不稳定等缺陷。来源于石油热袍菌(*Thermotoga petrophila*)的塔格糖酮酸3-差向异构酶(tagaturonate 3-epimerase)经过分子改造后,能够以*D*-果糖为底物经差向异构反应合成*D*-塔格糖,该突变体被命名为塔格糖4-差向异构酶(tagatose 4-epimerase,T4E)。作者通过在T4E的N端添加T7 tag,使其在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)BL21(DE3)中成功表达并测定了T4E的酶学性质,优化了T4E催化*D*-果糖合成*D*-塔格糖的生物转化条件,同时对异源表达T4E的*E. coli* BL21(DE3)重组细胞进行硅藻土-海藻酸钠固定化研究。结果表明,在最适条件下,以300 g/L的*D*-果糖为底物,反应4 h后其平衡转化率可达25%。与游离细胞中的T4E相比,经全细胞固定化后的T4E热稳定性显著提高,可连续反应7个批次,具有较高的工业应用价值。

关键词: *D*-塔格糖;塔格糖4-差向异构酶;大肠杆菌;全细胞固定化

Recombinant Expression and Whole-Cell Immobilization of Tagatose 4-Epimerase from *Thermotoga petrophila* in *Escherichia coli*

GUO Xuehong[1,2,3,4] *LIU Zhanzhi*[1,2,3,4] *XU Ying*[1,2,3,4] *WU Jing*[1,2,3,4*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *D*-tagatose is a rare sugar with multiple physiological functions, but its current biological production methods face challenges such as high substrate costs and unstable supply. After molecular modification, the tagatoronate 3-epimerase from *Thermotoga petrophila* can synthesize *D*-tagatose through epimerization reaction with *D*-fructose as substrate, and this mutant is denoted as tagatose 4-epimerase (T4E). This study successfully expressed T4E in *Escherichia coli* BL21 (DE3) through fusion of T7 tag to its N-terminal, characterized its enzymatic properties, and optimized the bioconversion conditions for the synthesis of *D*-tagatose from *D*-fructose catalyzed by T4E. Meanwhile, the immobilization of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) cells expressing heterologous T4E using diatomaceous earth-sodium alginate was studied. The results showed that under optimal conditions, the

基金项目: 国家“十四五”重点研发计划项目(2022YFC2104900);国家自然科学基金项目(32101884);2022年度德州市重大科技创新工程项目。

通信作者: 吴敬(1969—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事基因工程高效表达系统的构建、酶制剂的蛋白质工程改造以及基因水平的代谢工程菌种改造。E-mali:jingwu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2023-02-11 **修回日期:** 2023-03-07

equilibrium conversion rate could reach 25% after 4 h of reaction with 300 g/L *D*-fructose as the substrate. Compared with the T4E in free cells, the whole-cell immobilized T4E exhibited significantly improved thermal stability, enabling continuous reaction for seven batches and demonstrating high industrial application potential.
Keywords: *D*-tagatose; tagatose 4-epimerase; *Escherichia coli*; whole-cell immobilization

D-塔格糖是一种天然存在的己酮糖，是*D*-果糖C_4位上的差向异构体，其甜度达到蔗糖的92%，但能量仅为蔗糖的30%[1]。*D*-塔格糖具有改善肠道菌群、抑制糖尿病、抗龋齿等功效[2-6]，因此近年来受到了广泛关注。*D*-塔格糖在自然界中的含量极低，主要通过化学法或生物法生产[7]。化学法生产*D*-塔格糖存在反应条件剧烈且不易控制、副产物较多、不利于分离纯化等缺点[8]。生物法因具有转化率高、专一性强、副产物少、分离纯化简单等优点而成为合成*D*-塔格糖的主要方法[9]。生物法主要以乳糖为底物，通过*β*-半乳糖苷酶与*L*-阿拉伯糖异构酶双酶协同催化乳糖合成*D*-塔格糖[8,10-11]。该方法需要两步反应来合成*D*-塔格糖：首先通过*β*-半乳糖苷酶水解乳糖生成半乳糖和葡萄糖，然后通过*L*-阿拉伯糖异构酶催化半乳糖生成*D*-塔格糖。然而，由于该方法反应过程复杂且不易控制，乳糖的成本较高且利用率较低，进一步增加了该方法的成本。因此，寻找其他高效途径来制备*D*-塔格糖极具研究意义和应用价值。

D-果糖是*D*-塔格糖C_4位上的差向异构体，*D*-果糖相较于乳糖成本更低，而且供应更加稳定[12]，是生产*D*-塔格糖的理想底物。因此，迫切需要寻找能够催化*D*-果糖合成*D*-塔格糖的酶，以突破合成*D*-塔格糖的技术障碍。石油热袍菌是严格厌氧的超嗜热菌，其最佳生长温度为80 ℃[13-16]。Shin等[17]发现*Thermotoga petrophila*来源的塔格糖酮酸3-差向异构酶对*D*-果糖具有C_4异构化活性，并通过分子改造进一步提高该酶对*D*-果糖的C_4异构化活性，将得到的突变体命名为T4E。

细胞固定化技术是一种通过物理化学方法将游离细胞固定于有限空间内，同时保持其催化活性并能重复使用的技术[18]，具有操作简单、易于分离纯化、无需破碎细胞、成本低等优点。固定化后的酶或细胞在高温下表现出更高的稳定性，更易与产物分离，并且可以重复利用，能够满足工业化生产的需求，适用于食品、制药等多个领域。目前常用的细胞固定化技术是吸附包埋法，该方法具有操作简单、条件温和[19]、稳定性好、细胞容量高等优点。李秋喜等[20]利用海藻酸钠固定化产*D*-阿洛酮糖3-差向异构酶的大肠杆菌细胞，用于生产*D*-阿洛酮糖，经过8次重复操作后，固定化细胞的酶活力回收率仍能达到61%。耿梦华等[21]采用吸附交联法对短小芽孢杆菌来源的蔗糖异构酶进行固定化，在最佳转化条件下连续转化16次，产物得率仍保持在87.52%。

作者通过在T4E的N端添加T7 tag，使其在*E. coli* BL21（DE3）中成功表达并测定了T4E的酶学性质，探究了合成*D*-塔格糖的最适条件，并对其进行了全细胞固定化研究，为工业化生产*D*-塔格糖提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

4-（2-羟乙基）-1-哌嗪丙磺酸（HEPPS）、*D*-果糖：麦克林生化科技有限公司；聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）试剂盒：碧云天生物技术有限公司；DNA胶回收试剂盒：康为生物科技有限公司；T4E：由481个氨基酸组成，理论相对分子质量为58 400，NCBI登录号ABQ46504[16]；*t4e*基因及所需引物：金唯智生物科技有限公司；镍柱填料：GE Healthcare公司；*D*-果糖标准品、*D*-塔格糖标准品：维塔化学试剂有限公司；其他试剂：均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2　培养基及缓冲液

LB培养基：蛋白胨10 g，酵母粉5 g，NaCl 10 g，超纯水定容至1 L。TB培养基：蛋白胨10 g，酵母粉24 g，甘油10 g，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.43 g，KH_2PO_4 2.3 g，超纯水定容至1 L。

HEPPS缓冲液：20 mmol/L的HEPPS，pH 8.5。缓冲液A：Tris-HCl 25 mmol/L、NaCl 0.5 mol/L，pH 7.2~7.4。缓冲液B：Tris-HCl 25 mmol/L、NaCl 0.5 mol/L、咪唑0.5 mol/L，pH 7.2~7.4。缓冲液C：由缓冲液A和缓冲液B配制的不同浓度梯度的咪唑溶液。

1.3　T4E的异源表达

在*t4e*基因的N端添加T7 tag的基因序列，引物序列见表1。以pET-24a（+）-*t4e*为模板，T7-F/R为引物进行PCR扩增。PCR体系（50 μL）为：50 ng

模板，25 μL 2×Phanta Max，1 μL 上下游引物，用 ddH_2O 补至 50 mL。扩增程序为：98 ℃保持 3 min，30 个循环（98 ℃，30 s；55 ℃，30 s；72 ℃，7 min），72 ℃保持 5 min，最后于 4 ℃保温。将重组质粒转化至 *E. coli* BL21（DE3），挑取菌落至 LB 培养基，于 37 ℃培养 9 h。然后以体积分数 5% 将种子液接入 TB 培养基，于 37 ℃、200 r/min 培养 2 h。当菌液 OD_{600} 值为 0.8 时，加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG，于 25 ℃、200 r/min 诱导 24 h。诱导表达结束后，使用缓冲液重悬菌体并超声破壁，将破壁后的菌液于 12 000 r/min 离心 5 min，离心后的上清液和沉淀分别进行蛋白质电泳分析。

表 1　引物序列

Table 1　Primer sequence

引物名称	引物序列（5′—3′）	长度/bp
T7-F	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGGTTCTGAAA	74
T7-R	TTTCAGAACCATGGATCCGCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAA	74

1.4　T4E 的分离纯化

发酵液经过离心处理后收集菌体，随后使用 HEPPS 缓冲液重悬菌体并进行高压匀浆破壁，于 8 000 r/min 离心 20 min，收集上清液作为粗酶液。用缓冲液 A 平衡镍柱，并依次用咪唑浓度为 15、30、60、90、150、300 mmol/L 的缓冲液 C 洗脱不同结合能力的蛋白质。最后，对含有目的蛋白质的洗脱液进行超滤处理。

1.5　T4E 酶活力的测定

将 200 μL 酶液加到 800 μL 含有 50 mmol/L *D*-果糖的 HEPPS 缓冲液中，充分混匀后置于 70 ℃水浴中反应 30 min，随后煮沸 10 min 以终止反应。每分钟内产生 1 μmol/L *D*-塔格糖的酶量定义为一个酶活力单位（U）。

1.6　T4E 的酶学性质研究

1）最适温度的测定：取 200 μL T4E 酶液加到 800 μL 含有 50 mmol/L *D*-果糖的 HEPPS 缓冲液中，分别在不同温度（60~85 ℃）下反应 30 min，随后煮沸 10 min 以终止反应。定义最适温度下的酶活力为 100%，计算各温度下的相对酶活力。

2）最适 pH 的测定：取 200 μL T4E 酶液加到 800 μL 含有 50 mmol/L *D*-果糖的 HEPPS 缓冲液中，于 70 ℃下反应 30 min，随后煮沸 10 min 以终止反应。定义最适 pH 下的酶活力为 100%，计算各 pH 下的相对酶活力。

3）热稳定性：取一定量的 T4E 酶液置于最适温度孵育，每隔一段时间取出少量样品。定义反应 0 h 的酶活力为 100%，计算不同孵育时间的相对酶活力。

1.7　*D*-塔格糖的生物合成

1）酶质量浓度优化：以 300 g/L 的 *D*-果糖为底物，添加酶的质量浓度分别为 4.5、9.0、18.0 mg/mL，于 70 ℃下反应 5 h，每隔 1 h 取样并煮沸 10 min 灭酶。样品处理后用高效液相色谱测定 *D*-塔格糖的质量浓度。

2）温度优化：以 300 g/L 的 *D*-果糖为底物，添加酶的质量浓度为 4.5 mg/mL，Ni^{2+} 1.5 mmol/L，分别于不同温度（60~85 ℃）下反应 5 h，每隔 1 h 取样并煮沸 10 min 灭酶。样品处理后用高效液相色谱测定 *D*-塔格糖的质量浓度。

3）底物质量浓度优化：分别以质量浓度为 100、200、300、400、500、600、700、800 g/L 的 *D*-果糖为底物，添加酶的质量浓度为 4.5 mg/mL，于 70 ℃下反应 5 h，每隔 1 h 取样并煮沸 10 min 灭酶。样品处理后用高效液相色谱测定 *D*-塔格糖的质量浓度。

1.8　固定化细胞条件的优化

固定化细胞的制备过程如下：首先配制一定质量分数的海藻酸钠溶液，加热溶解并混合均匀。待溶液冷却后加入一定体积的菌悬液，随后加入适量硅藻土继续搅拌直至完全混匀。使用注射器将混合物缓慢滴入 $CaCl_2$ 溶液中，于 4 ℃静置硬化 3 h，随后用去离子水洗涤 3 次，最后将固定化的细胞保存在生理盐水中备用。

为了研究不同因素对固定化细胞酶活力回收率的影响，测定海藻酸钠质量分数、细胞包埋质量浓度、$CaCl_2$ 质量分数、硅藻土质量分数对固定化细胞酶活力回收率的影响。

1）游离细胞酶活力的测定：取一定量菌体加到 5 mL *D*-果糖浓度为 50 mmol/L 的 HEPPS 缓冲液中，75 ℃反应 30 min，煮沸 10 min 以终止反应。

2）固定化细胞酶活力的测定：称取一定量的固定化微球，加到5 mL *D*-果糖浓度为50 mmol/L的HEPPS缓冲液中，75 ℃反应30 min，煮沸10 min以终止反应。

3）固定化细胞酶活力回收率的测定：即固定化细胞酶活力与游离细胞酶活力的比值。

1.9　固定化细胞最适pH和最适温度的确定

按1.8优化后的条件制备固定化细胞。配制含50 mmol/L *D*-果糖的缓冲液（pH 7.5~9.5，Ni^{2+} 1.5 mmol/L），称取2 g固定化微球，按固定化细胞酶活力的测定方法测定酶活力。定义最适pH下的酶活力为100%，计算不同pH下的相对酶活力，从而确定固定化细胞的最适pH。在已确定的最适pH条件下，分别称取2 g固定化微球，加到上述反应体系中，于不同温度（60~85 ℃）下测定酶活力。定义最适温度下的酶活力为100%，计算不同温度下的相对酶活力，从而确定固定化细胞的最适温度。

1.10　固定化细胞的操作稳定性

将75 g/L的游离细胞与等量菌体制备的固定化微球分别加到10 mL的*D*-果糖质量浓度为100 g/L的反应体系中，在200 r/min的搅拌速度下分别于70 ℃和75 ℃下反应4 h，反应结束后取样并煮沸10 min以终止反应。之后用去离子水清洗固定化微球3次，然后重新加入底物继续新一轮的反应，连续反应7个批次。

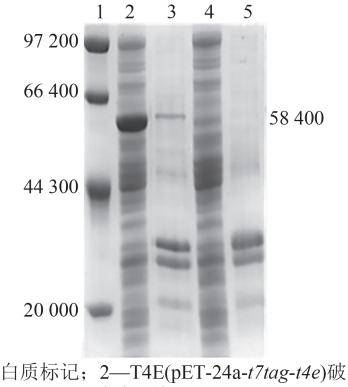
1.11　*D*-塔格糖质量浓度的测定

样品经过灭酶处理后，于12 000 r/min离心5 min，随后取上清液并将其稀释到合适质量浓度，对稀释后的样品进行过滤处理。色谱条件：Agilent 1200 HPLC色谱仪，Agilent Hi-Plex Ca色谱柱（300 mm×7.7 mm），流动相为纯水，柱温为80 ℃，流量为0.5 mL/min。

2　结果与讨论

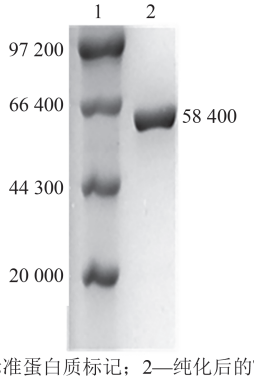
2.1　T4E的异源表达及纯化

T4E经过异源表达后，其SDS-PAGE结果见图1（a）。破壁后上清液与沉淀中均未观察到目的蛋白质条带。随后在T4E的N端添加T7 tag，结果显示在相对分子质量为58 400处有明显蛋白质条带，与T4E的理论相对分子质量一致，表明添加T7 tag后T4E成功实现了重组表达。T4E经过镍柱纯化后，纯化条带单一且其相对分子质量与T4E一致，见图1（b），表明T4E成功纯化。



1—标准蛋白质标记；2—T4E(pET-24a-*t7tag-t4e*)破壁上清液；3—T4E(pET-24a-*t7tag-t4e*)破壁沉淀；4—T4E(pET-24a-*t4e*)破壁上清液；5—T4E(pET-24a-*t4e*)破壁沉淀。

(a) T4E的表达



1—标准蛋白质标记；2—纯化后的T4E。

(b) T4E的纯化

图1　SDS-PAGE结果

Fig. 1　SDS-PAGE results

2.2　T4E酶学性质测定

2.2.1　比活力

T4E的比活力为0.14 U/mg，高于文献[17]中报道的0.12 U/mg，这种差异可能是由于表达宿主的不同所致。本研究中的表达宿主为*E. coli* BL21（DE3），而文献[17]中使用的表达宿主为*E. coli* ER2566。此外，添加T7 tag也可能是导致T4E比活力改变的原因之一。

2.2.2　最适温度

T4E相对酶活力随着温度的升高呈先升高后降低的趋势，当温度为70 ℃时其相对酶活力最高，见图2。表明T4E的最适温度为70 ℃，这一结果低于

文献[17]中报道的80 ℃。与80 ℃相比，在70 ℃时底物*D*-果糖不易发生褐变反应，不会影响后续产品的分离及品质。因此，本研究中通过*E. coli* BL21（DE3）异源表达的T4E相比于文献中表达的T4E，更适于工业化应用。

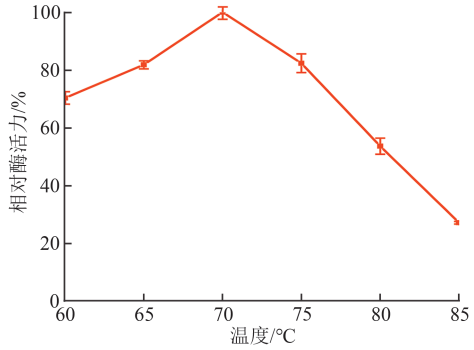


图2　T4E最适温度的确定

Fig. 2　Determination of the optimal temperature for T4E

2.2.3　最适pH

在不同pH（7.0~9.5）的缓冲液体系中测定T4E的相对酶活力，结果见图3。在pH为7.0~8.5时，相对酶活力随着pH的增大而升高；pH为8.5~9.5时，相对酶活力随着pH的增大逐渐降低。表明T4E的最适pH为8.5，这一结果与文献[17]报道的一致。

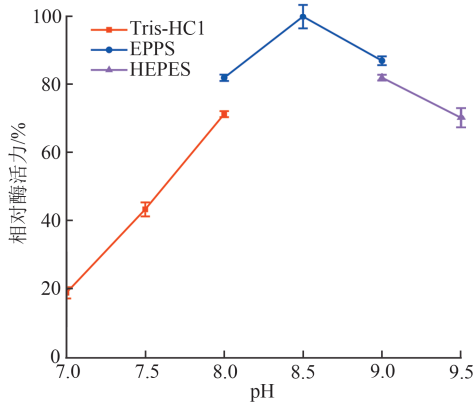


图3　T4E最适pH的确定

Fig. 3　Determination of the optimal pH for T4E

2.2.4　热稳定性

T4E在70 ℃下的热稳定性结果见图4。随着孵育时间的延长，其相对酶活力逐渐降低，半衰期为2.9 h。T4E在70 ℃下孵育5 h后其相对酶活力仅为初始酶活力的28.6%，说明其热稳定性较差，具有一定的提升空间。

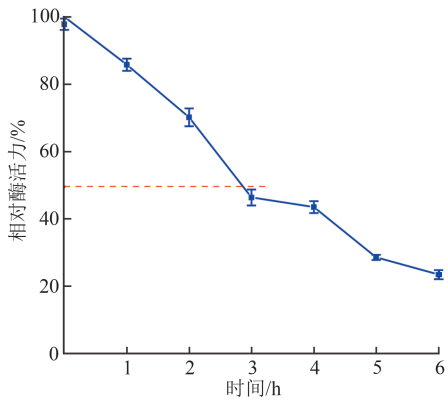


图4　T4E的热稳定性

Fig. 4　Thermal stability of T4E

2.3　*D*-塔格糖的生物合成

酶质量浓度、温度和底物质量浓度对*D*-塔格糖转化率的影响见图5。T4E的转化率随着酶质量浓度的增加而逐渐升高，当酶质量浓度为18.0 mg/mL时，转化率可达25%；在相同的酶质量浓度下，*D*-塔格糖转化率在4 h达到平衡，见图5（a）。另外，70 ℃是T4E合成*D*-塔格糖的最佳温度，见图5（b）。使用不同质量浓度的*D*-果糖为底物进行*D*-塔格糖的生物合成，结果表明当*D*-果糖质量浓度为800 g/L时，*D*-塔格糖的质量浓度可达96 g/L，见图5（c）。

2.4　固定化细胞条件的优化

由于T4E的热稳定性较差且比酶活力较低，作者提出通过固定化的方法提升其使用次数和多批次反应能力。Lernia等[22]在75 ℃下对大肠杆菌细胞进行热处理以增加细胞的通透性，结果发现经过热处理的大肠杆菌细胞可显著提高海藻糖的产量。固定化细胞的最适温度为75 ℃，在该温度下，大肠杆菌细胞膜蛋白质变性形成小孔，导致细胞膜的通透性增加[23]，从而降低了细胞膜的屏障作用。同时，在该温度下大部分的杂蛋白质变性失活，减少了副产物的产生，有利于产物的分离纯化。因此，作者使用全细胞进行固定化，在保证*D*-塔格糖产量的同时避免了细胞破壁和蛋白质纯化带来的成本增加。此外，硅藻土-海藻酸钠作为一种常规的固定化方法，不仅成本较低，而且固定化工艺也更加成熟。海藻酸钠具有较好的包埋作用，能够避免细胞的损失，而硅藻土则具有优良的吸附能力，常被作为吸附载体用于全细胞固定化。

海藻酸钠具有生物可降解、稳定、无毒、成球性好等优点，是常用的固定化材料[24]，其质量分数对

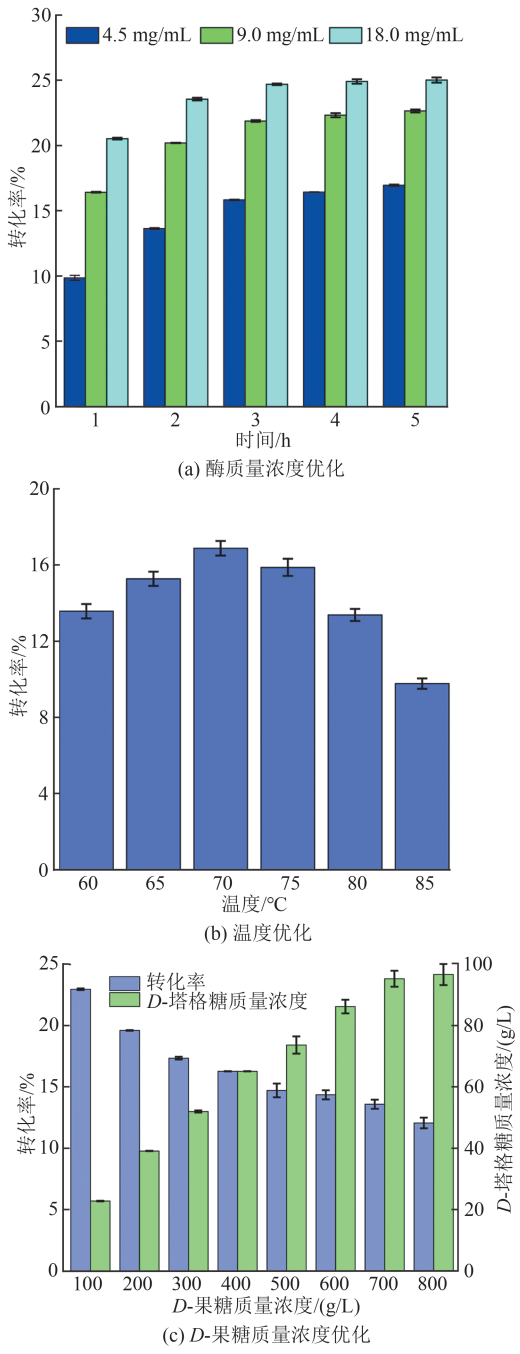


图5　*D*-塔格糖合成条件的优化

Fig. 5　Optimization of *D*-tagatose synthesis conditions

固定化细胞的传质和硬度均有影响。陈九武等[25]通过优化海藻酸钠质量分数发现，质量分数为2.5%时活性最高。当细胞包埋质量浓度为50 g/L、硅藻土质量分数为1.5%、$CaCl_2$质量分数为1.5%时，研究海藻酸钠质量分数对细胞酶活力回收率的影响，见图6(a)。结果表明，海藻酸钠质量分数为1.0%时，固定化细胞的酶活力回收率最高，达到64%。

固定化细胞的包埋质量浓度是影响固定化细胞酶活力回收率的主要因素，合适的细胞包埋质量浓度对提高固定化细胞的酶活力回收率至关重要。在海藻酸钠质量分数为1.0%、硅藻土质量分数为1.5%、$CaCl_2$质量分数为1.5%时，研究细胞包埋质量浓度对细胞酶活力回收率的影响，见图6(b)。结果表明，细胞包埋质量浓度为75 g/L时，固定化细胞的酶活力回收率最高，为58%。

$CaCl_2$的主要作用是硬化固定化微球，其质量分数对固定化微球的硬度有一定影响。在海藻酸钠质量分数为1.0%、硅藻土质量分数为1.5%、细胞包埋质量浓度为75 g/L时，研究不同$CaCl_2$质量分数对细胞酶活力回收率的影响。结果表明，当$CaCl_2$质量分数为2.0%时，固定化细胞的酶活力回收率最高，为71%，见图6(c)。另外，$CaCl_2$在该质量分数下，能够在保证固定化细胞重复次数的同时维持一定的传质速率。

硅藻土能够增强固定化微球的机械强度，但随着其质量分数的增加，会吸附大量的大分子物质和水，使固定化微球的体积膨胀[26]。曾胤新[27]发现当固定化微球体积膨胀时，会明显影响其机械强度和多批次反应能力。当海藻酸钠质量分数为1.0%、$CaCl_2$质量分数为2.0%、细胞包埋质量浓度为75 g/L时，研究硅藻土质量分数对细胞酶活力回收率的影响。结果表明，当硅藻土质量分数为1.5%时，固定化细胞的酶活力回收率有一定的提升，为67%，见图6(d)。通过硅藻土-海藻酸钠固定化细胞，可以使细胞与固定化材料之间的结合更加牢固，避免细胞脱落，同时硅藻土能够使紧实的载体变得更加松散，有利于底物分子的进入，从而提高酶的传质速率。

2.5　固定化细胞的酶学性质及操作稳定性

2.5.1　固定化细胞的最适pH和温度

固定化细胞在不同pH(7.5~9.5)缓冲液体系中的相对酶活力结果见图7(a)，结果表明固定化细胞的最适pH为8.5。另外，将固定化细胞分别在60~85 ℃下反应，测定其酶活力，确定固定化细胞的最适反应温度为75 ℃，见图7(b)。

2.5.2　固定化细胞的操作稳定性

在70 ℃下反应时，游离细胞的初始转化率为15%，固定化细胞为14%；在75 ℃下反应时，游离细胞的初始转化率为17%，而固定化细胞为15%。尽管固定化细胞的初始转化率略低于游离细胞，但在操作稳定性方面有所提升，见图8。在70 ℃和75 ℃

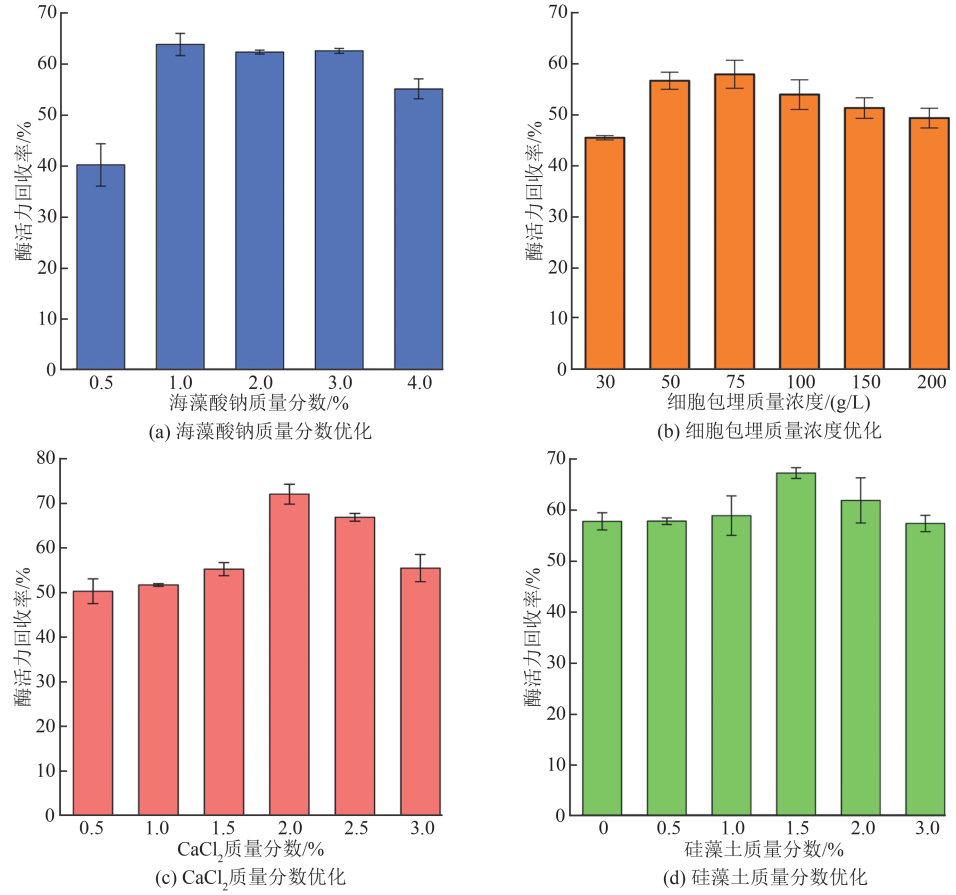


图 6 固定化细胞条件的优化

Fig. 6 Optimization of immobilized cell conditions

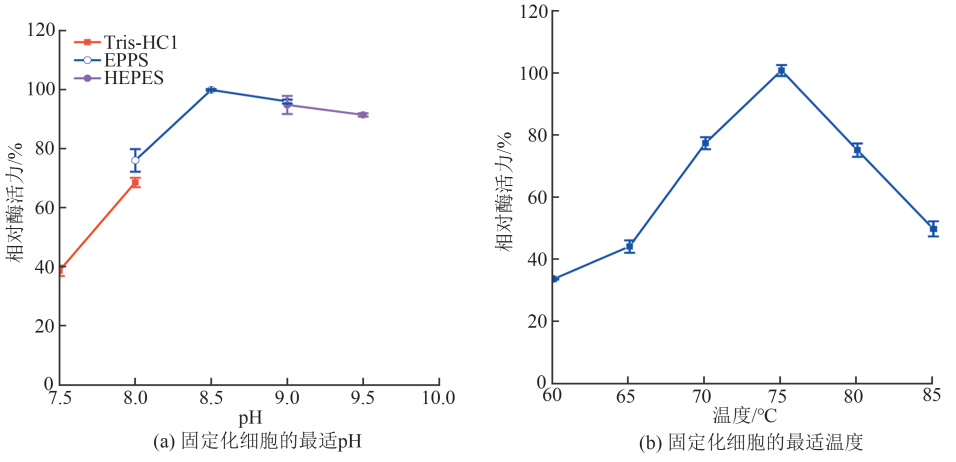
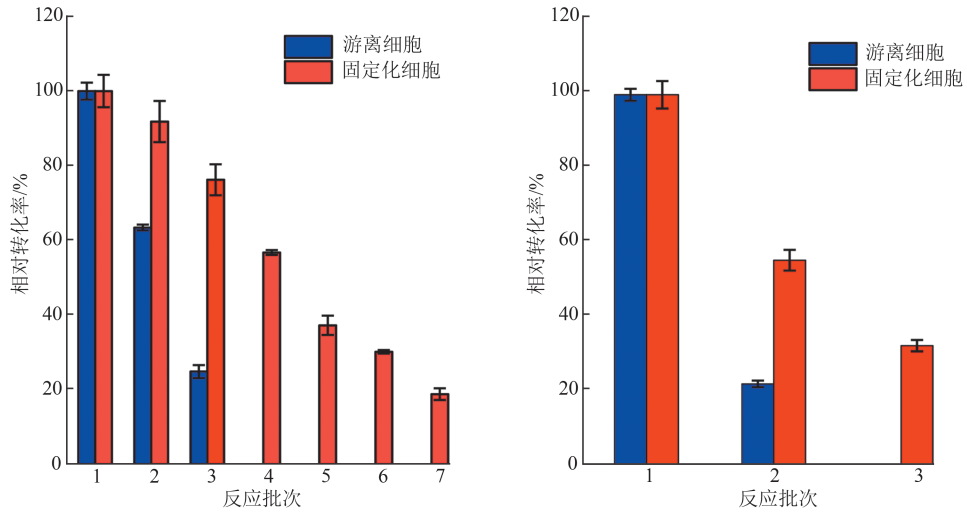


图 7 固定化细胞的最适 pH 和温度

Fig. 7 Optimal pH and temperature for immobilized cells

下，固定化细胞均表现出较强的稳定性。特别是在 70 ℃时，固定化细胞经过 7 个批次（28 h）的反应后，其转化率仍保持在初始值的 20%，而相同条件下的游离细胞只能反应 3 个批次。表明固定化细胞与游离细胞相比具有较好的操作稳定性和多批次反应能力。然而，由于 T4E 本身的热稳定性较差且酶活力较低，导致固定化细胞在每个批次中的酶活力损失严重，从而降低了固定化细胞的操作稳定性和多批次反应能力。另外，由于固定化细胞的反应温度较高，使作为固定化载体的海藻酸钠黏性下降，进而



(a) 70 ℃的操作稳定性　　(b) 75 ℃的操作稳定性

图 8　固定化细胞的操作稳定性

Fig. 8　Operational stability of immobilized cells

影响了包埋效果，导致固定化细胞的操作稳定性降低。因此，未来需要对包埋材料进行优化，寻找更适合在高温环境下使用的新型包埋材料。

3　结论

通过添加T7 tag成功实现了T4E在*E. coli* BL21（DE3）中的异源表达。T4E的酶学性质结果显示，其比活力为0.14 U/mg，最适pH为8.5，最适温度为70 ℃，在最适温度下T4E的半衰期为2.9 h。使用*D*-果糖作为底物合成*D*-塔格糖，在4 h反应达到平衡状态。当加酶质量浓度为18.0 mg/mL、*D*-果糖质量浓度为300 g/L，反应4 h后其平衡转化率达到25%，*D*-塔格糖产量为75 g/L。研究发现，T4E在70 ℃下的转化率高于80 ℃，且在70 ℃下果糖不会发生褐变，因此该研究表达的T4E更适于工业化应用。另外，T4E的全细胞固定化研究结果表明，与游离细胞相比，固定化细胞显著提高了T4E的热稳定性和循环使用次数，延长了连续反应时间，具有较高的工业应用价值。

参考文献

[1] MOCHIZUKI S，FUKUMOTO T，OHARA T，et al. The rare sugar *D*-tagatose protects plants from downy mildews and is a safe fungicidal agrochemical[J]. Communications Biology，2020，3：423.

[2] BERTELSEN H，JENSEN B B，BUEMANN B. *D*-tagatose：a novel low-calorie bulk sweetener with prebiotic properties[J]. World Review of Nutrition and Dietetics，1999，85：98-109.

[3] NORMÉN L，LAERKE H N，JENSEN B B，et al. Small-bowel absorption of *D*-tagatose and related effects on carbohydrate digestibility：an ileostomy study [J]. The American Journal of Clinical Nutrition，2001，73(1)：105-110.

[4] DONNER T W，WILBER J F，OSTROWSKI D. *D*-tagatose，a novel hexose：acute effects on carbohydrate tolerance in subjects with and without type 2 diabetes[J]. Diabetes，Obesity & Metabolism，1999，1(5)：285-291.

[5] LU Y，LEVIN G V. Removal and prevention of dental plaque with *D*-tagatose [J]. International Journal of Cosmetic Science，2002，24(4)：225-234.

[6] NAGATA Y，MIZUTA N，KANASAKI A，et al. Rare sugars，*D*-allulose，*D*-tagatose and *D*-sorbose，differently modulate lipid metabolism in rats [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture，2018，98(5)：2020-2026.

[7] JAYAMUTHUNAGAI J，GAUTAM P，SRISOWMEYA G，et al. Biocatalytic production of *D*-tagatose：a potential rare sugar with versatile applications[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition，2017，57(16)：3430-3437.

[8] KIM P. Current studies on biological tagatose production using *L*-arabinose isomerase：a review and future perspective [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2004，65(3)：243-249.

[9] QI Z L，ZHU Z L，WANG J W，et al. Biochemical analysis and the preliminary crystallographic characterization of *D*-tagatose 3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* [J]. Microbial Cell Factories，2017，16(1)：193.

[10] KIM H J，OH D K. Purification and characterization of an *L*-arabinose isomerase from an isolated strain of

Geobacillus thermodenitrificans producing *D*-tagatose [J]. Journal of Biotechnology, 2005, 120(2): 162-173.

[11] 董艺凝,陈海琴,张灏,等. *β*-半乳糖苷酶的研究现状与进展[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(4):337-343.
DONG Y, CHEN H Q, ZHANG H, et al. Research status and progress on *β*-galactosidase[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(4): 337-343.(in Chinese)

[12] HENAO-VELÁSQUEZ A F, MÚNERA-BEDOYA O D, HERRERA A C, et al. Lactose and milk urea nitrogen: fluctuations during lactation in Holstein cows [J]. Revista Brasileira de Zootecnia, 2014, 43(9): 479-484.

[13] 邢岩,邱爽,聂慧慧,等. *Thermotoga petrophila* 普鲁兰酶基因的异源表达与酶学性质分析[J]. 河南农业大学学报,2018,52(3):404-411,423.
XING Y, QIU S, NIE H H, et al. Heterologous expression and enzymatic characterization of the pullulanase from *Thermotoga petrophila*[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2018, 52(3): 404-411, 423.(in Chinese)

[14] TAKAHATA Y, NISHIJIMA M, HOAKI T, et al. *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(5): 1901-1909.

[15] SUMMERS Z M, BELAHBIB H, PRADEL N, et al. A novel *Thermotoga* strain TFO isolated from a Californian petroleum reservoir phylogenetically related to *Thermotoga petrophila* and *T. naphthophila*, two thermophilic anaerobic isolates from a Japanese reservoir: taxonomic and genomic considerations[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2020, 43(6): 126132.

[16] QI X, TESTER R F. Fructose, galactose and glucose: in health and disease[J]. Clinical Nutrition ESPEN, 2019, 33: 18-28.

[17] SHIN K C, LEE T E, SEO M J, et al. Development of tagaturonate 3-epimerase into tagatose 4-epimerase with a biocatalytic route from fructose to tagatose[J]. ACS Catalysis, 2020, 10(20): 12212-12222.

[18] 于梅艳,姜巧娟. 细胞固定化技术及其应用的研究进展[J]. 生物技术世界,2012,9(2):7-9.
YU M Y, JIANG Q J. Advances in immobilized cells and its applications[J]. Biotech World, 2012, 9(2): 7-9.(in Chinese)

[19] 汝成业,张娟,堵国成,等. 包埋固定化酶降解牛奶 α_{s1}-酪蛋白过敏性研究[J]. 食品与生物技术学报,2016,35(4):387-392.
RU C Y, ZHANG J, DU G C, et al. Allergenicity investigation of hydrolyzed α_{s1}-casein in bovine milk by immobilized protease[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2016, 35(4): 387-392.(in Chinese)

[20] 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[J]. 食品工业科技,2015,36(7):172-176.
LI Q X, LIN C F, MU W M, et al. Research of the immobilization of microbial cells in sodium alginate for *D*-psicose conversion[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(7): 172-176.(in Chinese)

[21] 耿梦华,陈晟,吴敬,等. 吸附交联法固定化蔗糖异构酶及其在异麦芽酮糖制备中的应用[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(4):104-110.
GENG M H, CHEN S, WU J, et al. Immobilization of sucrose isomerase by adsorption and crosslinking method for the synthesis of isomaltulose[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 104-110.(in Chinese)

[22] LERNIA I, SCHIRALDI C, GENEROSO M, et al. Trehalose production at high temperature exploiting an immobilized cell bioreactor[J]. Extremophiles, 2002, 6(4): 341-347.

[23] 王艺颖,董钰漫,尹伟,等. 全细胞生物催化过程强化的研究进展[J]. 化学通报,2020,83(10):875-882.
WANG Y Y, DONG Y M, YIN W, et al. Progress in the process intensification of whole-cell biocatalysis [J]. Chemistry, 2020, 83(10): 875-882.(in Chinese)

[24] 刘峥,林原斌,吕慧丹. 交联海藻酸钠磁性微球的制备及固定化胰蛋白酶研究[J]. 材料导报,2006,20(12):137-140,147.
LIU Z, LIN Y B, LU H D. Study on preparation of magnetic particle of crosslinked sodium alginate and immobilization of trypsin[J]. Materials Review, 2006, 20(12): 137-140, 147.(in Chinese)

[25] 陈九武,赵学慧,吴思方. 固定化细胞合成酯类载体的研究[J]. 工业微生物,1997,27(3):29-33.
CHEN J W, ZHAO X H, WU S F. Studies on carriers used in synthesis of ester by immobilized cells [J]. Industrial Microbiology, 1997, 27(3): 29-33.(in Chinese)

[26] 肖美燕,徐尔尼,陈志文. 包埋法固定化细胞技术的研究进展[J]. 食品科学,2003,24(4):158-161.
XIAO M Y, Xu E N, Chen Z W. Development and application of the immobilized cell technology by entrapping methods[J]. Food Science, 2003, 24(4): 158-161.(in Chinese)

[27] 曾胤新. 产菊糖酶固定化细胞包埋剂的筛选[J]. 食品科学,1998,19(9):20-23,89.
ZENG Y X. Selection of carrier for immobilized cells with inulinase[J]. Food Science, 1998, 19(9): 20-23, 89.(in Chinese)

(责任编辑:刘冬梅)