

解脂耶氏酵母表面展示 β -淀粉酶与 α -葡萄糖转苷酶及一步法由淀粉合成低聚异麦芽糖

刘大文, 程海荣, 邓子新

上海交通大学 生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240

刘大文, 程海荣, 邓子新. 解脂耶氏酵母表面展示 β -淀粉酶与 α -葡萄糖转苷酶及一步法由淀粉合成低聚异麦芽糖. 生物工程学报, 2019, 35(1): 121-132.

Liu DW, Cheng HR, Deng ZX. One step production of isomalto-oligosaccharides by engineered *Yarrowia lipolytica* yeast co-displayed β -amylase and α -transglucosidase. Chin J Biotech, 2019, 35(1): 121-132.

摘要: 低聚异麦芽糖 (IMO) 所具有的良好理化性质和生理功能, 使得其在食品、医药、饲料、化妆品等领域得到广泛应用。但目前工业上采用多酶协同法由淀粉合成低聚异麦芽糖, 步骤繁琐、成本较高。因此开发出更加经济简便的方法生产低聚异麦芽糖具有重要的应用价值。通过将 β -淀粉酶 (β a) 和耐热 α -葡萄糖转苷酶 (GT) 以不同的方式进行融合, 并利用表面展示系统固定在食品安全微生物解脂耶氏酵母细胞表面, 实现自我表达与固定。筛选得到高产菌株 $Y_{\beta a-GT29}$ 。大量培养获得细胞, 转化液化的淀粉可实现一步法合成 IMO, 50 °C 转化 20 h 即可得到纯度为 75.3% 的低聚异麦芽糖, 方便了低聚异麦芽糖的生产。

关键词: 解脂耶氏酵母, 酵母表面展示, 低聚异麦芽糖, β -淀粉酶, 耐热 α -葡萄糖转苷酶

One step production of isomalto-oligosaccharides by engineered *Yarrowia lipolytica* yeast co-displayed β -amylase and α -transglucosidase

Dawen Liu, Hairong Cheng, and Zixin Deng

State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Isomalto-oligosaccharides (IMO) have good physicochemical properties and excellent physiological functions to make it widely used in food, medicine, feed, cosmetics and other industries. However, the procedures for industrial production of IMO are complicated. Therefore, it is necessary to develop an economical and easy-to-operate method. The genes encoding for β -amylase and α -transglucosidase were fused and co-displayed on the yeast cell surface of *Yarrowia lipolytica* which can convert liquefied starch to IMO in one step. The highest IMO purity of 75.3% was obtained using the displayed fusion-enzyme at 50 °C. This method showed potential application in IMO production.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, yeast surface display, isomalto-oligosaccharides, β -amylase, α -transglucosidase

Received: March 9, 2018; **Accepted:** May 16, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21661140002).

Corresponding author: Hairong Cheng. Tel: +86-21-34206119; E-mail: chrqrq@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21661140002) 资助。

网络出版时间: 2018-10-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20181015.1324.001.html>

低聚异麦芽糖 (Isomalto-oligosaccharides, 简称 IMO) 是一类含有一个或多个 α -1,6 糖苷键的多聚葡萄糖 (Glucose oligomers), 除了含有 α -1,6 糖苷键外, 还可以同时含有 α -1,4 糖苷键。IMO 通常包括异麦芽糖、潘糖、异潘糖、异麦芽三糖、异麦芽四糖、异麦芽五糖以及更长糖链的低聚糖^[1]。另外, 国际上通常把含有 α -1,2 糖苷键或 α -1,3 糖苷键的多聚葡萄糖也划分为低聚异麦芽糖的范畴^[2]。IMO 的聚合度通常为 2-10, 但目前由酶转化的 IMO 聚合度通常为 2-4, 即异麦芽糖、潘糖、异潘糖、异麦芽三糖以及异麦芽四糖。IMO 在食品、医药以及化妆品领域都有应用, 在食品领域应用最广泛。作为一种优良的益生元, IMO 能显著提高机体消化道内益生菌的群体数量, 维持稳定健康的微生态, 促进消化道对矿物质的吸收, 调节胆固醇与甘油三酯的水平, 还能提高机体的免疫功能^[3-6]。基于 IMO 的生理功能, IMO 已经在乳制品、酵素、功能饮品、黄酒等食品中得到非常广泛的应用。目前世界很多国家都已批准 IMO 在食品中的应用, 因此市场占有率逐年上升^[7]。

典型的 IMO 的合成方法是采用多酶协同法, 出发原料为玉米淀粉。首先, 玉米淀粉经过乳化加入中温或者高温 α -淀粉酶液化为麦芽糊精 (Maltodextrin), 再加入真菌 β -淀粉酶 (β -amylase) 与普鲁兰酶 (Pullulanase) 进行糖化, 糖化液含有 50% 以上含量的麦芽糖, 最后加入曲霉来源的 α -葡萄糖转苷酶 (α -transglucosidase) 在 50 °C 下进行转糖基反应, 生成含有 α -1,6 糖苷键的低聚异麦芽糖^[8], 这种典型的三步法合成 IMO 步骤多, 使用酶多且过程长。后来又开发出两步酶转化法^[9]: 首先玉米淀粉经过乳化加入中温或者高温 α -淀粉酶液化为麦芽糊精 (Maltodextrin), 然后加入具有水解与转苷酶活性的麦芽糖淀粉酶 (Maltogenic α -amylase), 合成 IMO。我国学者 Lin 等^[10]利用水稻淀粉为底物, 利用新普鲁兰酶 (Neopullulanase) 与糖化淀粉酶 (Saccharifying α -amylase) 组合, 加入到水稻淀粉乳中, 57 °C 反应 72 h 能得到纯度为 59.2% 的 IMO。该

方法不用单独在高温下液化淀粉, 直接在淀粉乳中加入上述两种酶, 较两步法更为简便。

虽然上述合成 IMO 的方法能够以淀粉为原料合成 IMO, 但均首先需要通过发酵的方法制备酶, 制备酶的过程较为费时而且成本较高, 转化时间也较长。因此, 开发一种无需制备纯酶、转化时间又短的合成方法对于进一步降低成本具有重要的意义。本研究采用食品安全的解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 为出发菌株, 通过将 β -淀粉酶与 α -葡萄糖转苷酶融合在一起, 利用酵母展示系统将融合酶固定在细胞表面, 培养酵母细胞, 转化液化的淀粉一步法合成 IMO。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

大肠杆菌 Top 10 作为质粒扩增宿主, BL21 (DE3) 作为质粒表达宿主, 均为本实验室保存。LB 培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 10 g/L NaCl) 37 °C 培养, LB 中添加 100 μ g/mL 氨苄青霉素用作筛选。

解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* CGMCC7326 作为酶表面展示宿主, 为本实验室保存。YPD 培养基 (10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 酵母提取物, 20 g/L 葡萄糖) 30 °C 培养, YPD 中添加 200 μ g/mL 潮霉素 B 作为筛选使用。

1.2 菌株的构建

1.2.1 构建包含 β -淀粉酶基因 (β -amylase) 的酵母展示菌株

耐热 β -淀粉酶基因来自热硫嗜热厌氧杆菌 *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* (GenBank Accession No. M22471), 基因大小为 1 668 bp^[11]。该基因按照酵母 *Y. lipolytica* 密码子进行优化并委托安徽通用生物技术有限公司进行全基因合成, 合成后亚克隆到用 *Bam*H I 与 *Kpn* I 双酶切的载体 pINA1313^[12] 中, 构成新质粒 pINA1313- β -amylase。*Y. lipolytica* 的锚定蛋白 Pir1 基因 (GenBank Accession No. AF336989, 861 bp)

采用一对引物 P_{pir1-F} 与 P_{pir1-R} 进行 PCR 扩增并亚克隆到 Pml I 与 Bam H I 双酶切的质粒 pINA1313- β -amylase 中, 构成新质粒 pINA1313-Pir1- β -amylase。再采用一对引物 P_{hp4d-F} 与 P_{hph-R} , 以质粒 pUB4-CRE 为模板^[13], 将抗性筛选标记基因片段扩增 (大小 1.5 kb) 后连接到用 Sal I 与 Cla I 双酶切的载体 pINA1313-Pir1- β -amylase 中, 最后构建含 β -淀粉酶表面展示表达盒与抗性筛选标记的 *Y. lipolytica* 酵母整合表达载体 pSWV- β -amylase。

1.2.2 构建包含 α -葡萄糖苷酶基因 (α -transglucosidase, $GTase$) 的酵母展示菌株

耐热 α -葡萄糖转苷酶基因来自黑曲霉 *Aspergillus niger* (GenBank Accession No. D45356, 去除信号肽 57 个碱基后为 2 958 bp)^[14]。该基因按照酵母 *Y. lipolytica* 密码子进行优化并委托安徽通用生物技术有限公司进行全基因合成, 并亚克隆到用 Bam H I 与 Kpn I 双酶切的载体 pSWV- β -amylase 中, 构成新质粒 pSWV- $GTase$ 。

1.2.3 β -amylase 与 $GTase$ 融合基因质粒构建

β -amylase 与 $GTase$ 基因融合参考 Wang 等^[15]

引入 linker (5'-TTAGGATCTAGATCTGCCGAATT A-3'), 融合方式一种是 5'- β -amylase-linker- $GTase$ -3' (简称为 $\beta a-GT$), 另一种是 5'- $GTase$ -linker- β -amylase-3' (简称为 $GT-\beta a$), 融合所用的引物序列见表 1。先以质粒 pSWV- β -amylase 为模板, $P_{\beta 1-F}/P_{\beta 1-R}$ 一对引物扩出 β -amylase 基因; 以 pSWV- $GTase$ 为模板, 以 P_{G1-F}/P_{G1-R} 一对引物扩出 $GTase$ 基因; 以上两轮 PCR 产物作为混合模板 (含有 $GTase$ 基因与 β -amylase 基因), 以 $P_{\beta 1-F}$ 与 P_{G1-R} 一对引物扩出融合基因 $\beta a-GT$, 采用重组酶克隆法克隆到 Bam H I 与 Xho I 双切的载体 pSWV- β -amylase 中, 构成重组质粒 pSWV- $\beta a-GT$ 。

以 pSWV- $GTase$ 为模板, P_{G2-F}/P_{G2-R} 一对引物扩增出 $GTase$ 基因; 以 pSWV- β -amylase 为模板, $P_{\beta 2-F}/P_{\beta 2-R}$ 为引物扩出 β -amylase 基因。以上两轮 PCR 产物作为混合模板, 以 P_{G2-F} 与 $P_{\beta 2-R}$ 作为引物扩出融合基因 $GT-\beta a$, 采用重组酶克隆法克隆到 Bam H I 与 Xho I 双切的载体 pSWV- β -amylase 中, 构建重组质粒 pSWV- $GT-\beta a$ 。构建示意图如图 1 所示。

表 1 构建质粒所涉及到的引物

Table 1 Polymerase chain reaction primers used in this study

Primers name	Primer sequence (5'-3')	Enzyme sites
P_{pir1-F}	ACAC <u>ACG</u> TGATGCTCTTCAAGTCCGCTGCCGTCTCTC	<i>Pml</i> I
P_{pir1-R}	ACAGGATCC <u>TTA</u> ACAGTCCTCGAGGTTGACGATGGC	<i>Bam</i> H I
P_{hp4d-F}	ACA <u>ATCG</u> ATCTGAGGTGTCTACCAAGTGCCGTGC	<i>Cla</i> I
P_{hph-R}	ACAGTCGACCTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGG	<i>Sal</i> I
$P_{\beta 1-F}$	ACGACAAGGTCGAC <u>GGATCC</u> ATGATTGGAGCTTTTAAGCGACTG	<i>Bam</i> H I
$P_{\beta 1-R}$	TAATTCGGCAGATCTAGATCCTAAGTTCTGCCAGGTAATGGTGACAG	Linker
P_{G1-F}	TTAGGATCTAGATCTGCCGAATTAATGGTCAAGCTGACGCATCTCC	Linker
P_{G1-R}	TATCTGTAAATTGCCTCGAGCTACCACTCCAGCACCCAGTTCTC	<i>Xho</i> I
P_{G2-F}	CGACAAGGTCGAC <u>GGATCC</u> ATGGTCAAGCTGACGCATCTCC	<i>Bam</i> H I
P_{G2-R}	TAATTCGGCAGATCTAGATCCTAACCCTCCAGCACCCAGTTCTCGGC	Linker
$P_{\beta 2-F}$	TTAGGATCTAGATCTGCCGAATTAATGATTGGAGCTTTTAAGCGACTG	Linker
$P_{\beta 2-R}$	TATCTGTAAATTGCCTCGAGTTAGTTCTGCCAGGTAATGGTGACAG	<i>Xho</i> I
$P_{\beta G-F}$	GTGCCGCGCGGCAG <u>CCAT</u> ATGATTGGAGCTTTTAAGCGACTG	<i>Nco</i> I
$P_{\beta G-R}$	GTGGTGGTGGTGGTGGT <u>GCTCGAG</u> CTACCACTCCAGCACCCAGTTCTC	<i>Xho</i> I
$P_{G\beta-F}$	GTGCCGCGCGGCAG <u>CCAT</u> ATG-GTCAAGCTGACGCATCTCC	<i>Nco</i> I
$P_{G\beta-R}$	GTGGTGGTGGTGGTGGT <u>GCTCGAG</u> TTAGTTCTGCCAGGTAATGGTGACAG	<i>Xho</i> I

Note: Underlines indicate restriction enzyme recognition sites.

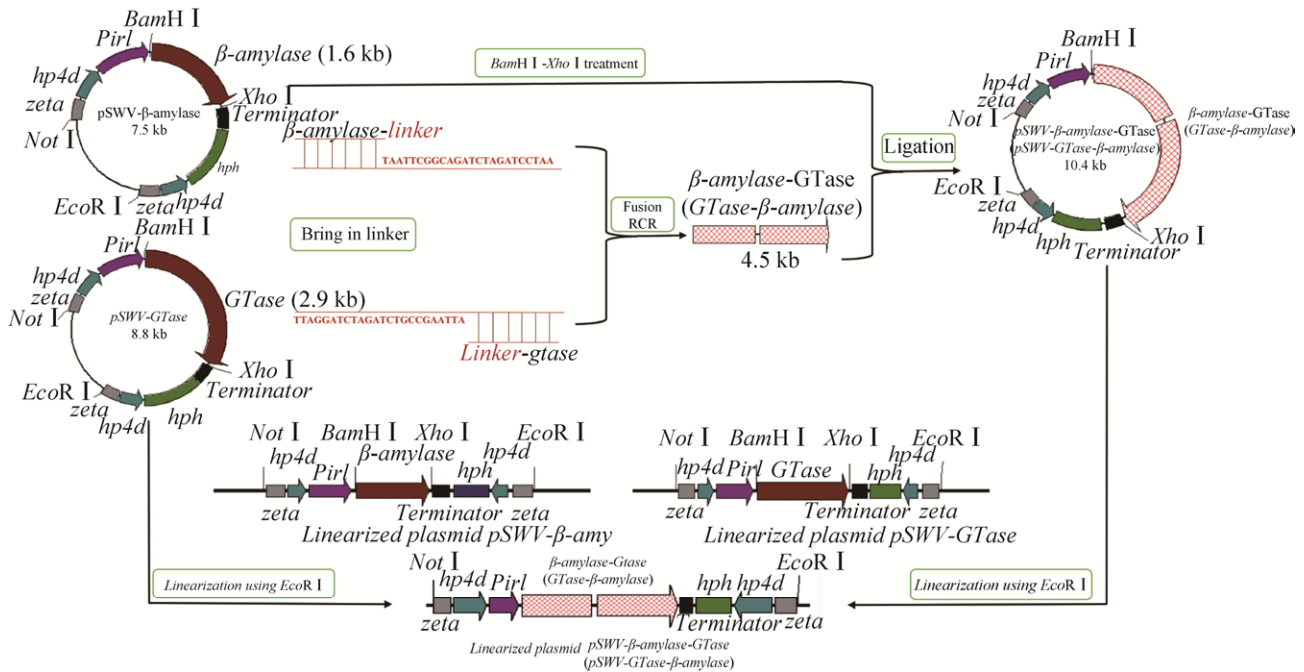


图1 β -amylase-GTase 与 GTase- β -amylase 基因合成、质粒构建及线性化流程图

Fig. 1 Scheme of the synthesis of β -amylase-GTase and GTase- β -amylase plasmid and the linearized functional elements.

1.2.4 大肠杆菌表达质粒的构建

以融合基因片段 β -a-GT 和 GT- β a 为模板设计引物见表 1, 引入酶切位点 *Nco* I 和 *Xho* I。以 β -a-GT 为模板, $P_{\beta G-F}$ 和 $P_{\beta G-R}$ 作为引物 PCR 获得片段, 重组连接入 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切载体 pET32b 得到重组质粒 pET32b- β -a-GT。以 GT- β a 为模板, $P_{G\beta-F}$ 和 $P_{G\beta-R}$ 作为引物 PCR 获得片段, 重组连接入双酶切载体 pET32b 得到重组质粒 pET32b-GT- β a。以 pSWV- β -amylase 质粒为模板, $P_{\beta G-F}$ 和 $P_{\beta G-R}$ 为引物 PCR 获得单个基因片段, 连入载体得到重组质粒 pET32b- β -amylase。以 pSWV-GTase 质粒为模板, $P_{G\beta-F}$ 和 $P_{\beta G-R}$ 为引物 PCR 获得单个基因片段, 连入载体得到重组质粒 pET32b-GTase。

1.3 菌株的纯化与表达

1.3.1 酵母菌株的纯化与鉴定

将上述质粒 pSWV- β -amylase、pSWV-GTase、

pSWV- β -a-GT 和 pSWV-GT- β a 使用 *Eco*R I 单酶切获得线性化片段, 参考 Chen 等^[16]报道的“醋酸锂一步转化法”转化解脂耶氏酵母, 将 *Y. lipolytica* CGMCC7326 在 30 °C 平板活化生长一夜, 取活化的菌株适量加入提前配置好的 200 μ L 转化缓冲液中 (400 g/L PEG 4 000, 150 mmol/L pH 6.0 醋酸锂, 150 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.2 mg/mL 单链 DNA), 加入线性化片段 3–5 μ g, 同时用 ddH₂O 作为空白对照, 39 °C 孵育 90 min, 将反应混合物涂布在潮霉素抗性 YPD 平板进行筛选。30 °C 稳定生长 3–5 d, 可获得单菌落 200–300 个, 取新的抗性平板纯化 3–4 次后, 获得稳定遗传转化子约 50 个。挑取转化子在 50 mL YPD 液体培养基, 30 °C、200 r/min 培养 1 d, 按照 Cheng 等^[17]报道的玻璃珠提取基因组的方法提取酵母转化子基因组, 将 pSWV- β -amylase 以 $P_{\beta 1-F}$ 和 $P_{\beta 1-R}$ 为引物、pSWV-GTase 以 P_{G1-F} 和 P_{G1-R} 为引物、pSWV- β -a-

GT 以 P _{β 1} 和 P_{G1-R} 为引物、pSWV-GT- β a 以 P_{G2-F} 和 P _{β 2-R} 为引物分别进行 PCR 筛选阳性转化子, 将以上各质粒转化酵母获得的转化子命名为 Y _{β a}、Y_{GT}、Y _{β a-GT} 和 Y_{GT- β a}。

1.3.2 酵母菌株活性的表达

为测定不同转化子活力, Y _{β a}、Y _{β a-GT}、Y_{GT- β a} 各挑选数个转化子接种于 50 mL YPD 液体培养基中, 30 °C 培养 2 d, 待 OD₆₀₀ 达到 15–20 时, 将菌液全部倒入 50 mL 离心管内, 10 000 r/min 离心 7 min, 除去上清, 得沉淀细胞, 使用无菌水洗涤细胞 2 次, 尽量除去水分后得纯净细胞, 湿重约 250 mg。配制 3% 可溶性淀粉溶液作为底物(即 3 g 淀粉溶解于 ddH₂O 中并定容至 100 mL, 淀粉需加热溶解成透明状), 取 15 mL 加入上述含纯净细胞的离心管, 放在 50 °C、200 r/min 反应, 定时取 1 mL 反应液入 EP 管内–20 °C 暂存。

同样将 Y_{GT}、Y _{β a-GT}、Y_{GT- β a} 各转化子得到的纯净细胞加入配制的底物 40% 麦芽糖溶液中(即 40 g 麦芽糖溶于 100 mL ddH₂O), 50 °C、200 r/min 反应, 定时取 1 mL 反应液入 EP 管内–20 °C 暂存以备后续监测产物。根据产物生成量计算出转化子的产率, 选择出最优转化子。

因 β -淀粉酶在 50–80 °C 条件下可达到 60% 以上活性, α -葡萄糖苷酶在 40–55 °C 条件下可达到 90% 以上活性, 选择两者适宜温度 50 °C 作为实验温度, 为两者融合创造最适宜温度。实验中以不含任何质粒的 *Y. lipolytica* 酵母细胞作为空白对照, 证明酶是否表达。

1.3.3 大肠杆菌菌株活性的表达

大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为质粒表达宿主, 利用载体所含抗性基因, 将含质粒 pET32b- β -amylase、pET32b-GTase、pET32b- β a-GT 和 pET32b-GT- β a 的菌液分别涂布在氨苄抗性 LB 平板获得大肠杆菌转化子, 分别命名为 E _{β a}、E_{GT}、E _{β a-GT} 和 E_{GT- β a}。

随机挑取转化子在 5 mL LB 抗性液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养约 3 h, 再将上述 5 mL 菌液接种于含 50 mL 抗性液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养约 6 h, 直到大肠杆菌 OD₆₀₀ 达到约 1.0 时, 加入 1 mmol/L IPTG 作为诱导剂, 转移至 16 °C、200 r/min 培养过夜, 实验选取 5 个转化子作为平行对照, 含 pET32b 质粒的菌株作为阴性对照, 不含质粒的菌株作为空白对照。

为测定大肠杆菌融合基因的表达, 对 E _{β a-GT}、E_{GT- β a} 所表达酶进行 SDS-PAGE 分析, 具体操作如下: 将诱导后的菌株细胞等细胞量各取两个平行样品, 10 000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 用 pH 8.0 Tris-HCl 缓冲液洗涤细胞一次后加入 20 μ L 悬浮细胞, 加入上样缓冲液(50 mmol/L pH 6.8 Tris-HCl, 100 mmol/L 二硫苏糖醇, 2% SDS, 0.1% 溴酚蓝, 10% 甘油)在沸水中煮 10 min, 离心所得上清即为上样样品。电泳使用金斯瑞 ExpressPlus™ 蛋白预制胶, 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 一切操作流程按照说明书具体要求操作。

将诱导后的菌液倒入 50 mL 离心管内, 6 000 r/min 离心 5 min, 去除上清培养基成分, 加入无菌水洗涤细胞 2 次, 获得纯净大肠杆菌细胞约 100 mg, 在 E _{β a}、E _{β a-GT}、E_{GT- β a} 细胞中加入 5 mL 3% 可溶性淀粉溶液, E_{GT}、E _{β a-GT}、E_{GT- β a} 细胞中加入 5 mL 40% 麦芽糖溶液, 分装于 1.5 mL EP 管内, 每管约 800 μ L, 50 °C、200 r/min 反应, 定时取样品–20 °C 暂存。

1.3.4 一步法由淀粉合成低聚异麦芽糖 (IMO)

取 6 个 500 mL 烧杯, 分别加入 150 mL ddH₂O 和 40 g 玉米淀粉, 95 °C 预热 5 min, 加入 0.2 g 耐高温 α -淀粉酶 (Sigma-A3306, >10 000 U/mL) 95 °C 继续反应, 用玻璃棒搅拌使反应充分, 在 2、4、6、10、15、20 min 时分别从中取出一只烧杯, 加入 HCl 使酶失去活性, NaOH 调 pH 至 7.0, 降至室温, 用 ddH₂O 定容至 200 mL。取 1 mL 样品

4 °C 暂存待测, 确定最适的玉米淀粉液化时间。将玉米淀粉按最适时间液化, 获得高浓度液化液, 加入到依照上述实验方法处理得到的 $Y_{\beta a-GT}$ 、 $Y_{GT-\beta a}$ 纯净酵母细胞中, 50 °C、200 r/min 反应, 定时取 1 mL 反应液入 EP 管内 4 °C 暂存。

1.4 产物的分析及酶活检测

将上述-20 °C 暂存样品室温溶解, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清入新 EP 管内离心 2 次, 获得纯净样品, 使用 HPLC 检测产物成分。色谱柱 1: Shodex KS802 (8 mm×300 mm), RI101 型示差折光检测器, 流动相 ddH₂O; 流速 1.0 mL/min, 柱温 70 °C, 进样量 20 μ L。色谱柱 2: Hydrophobic polystyrene gel (Shodex Rspak DC-613), RI101 型示差折光检测器, 流动相 75% 乙腈, 流速 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 20 μ L。

β -淀粉酶的一个活力单位 (U) 指在 50 °C 反应条件下每分钟产生 1 μ mol 麦芽糖所需的酵母细胞或者大肠杆菌细胞干重 (mg); α -葡萄糖转苷酶的一个活力单位 (U) 指在 50 °C 反应条件下每分钟转移 1 μ mol 麦芽糖所需的细胞干重 (mg)。

2 结果与分析

2.1 融合基因质粒表达盒的构建与表达

构建融合基因质粒表达盒需先扩增 β -amylase 与 $GTase$ 基因片段, 如图 2 所示, 左为 1.6 kb 大小的 β -amylase 片段与 2.9 kb 大小的 $GTase$ 片段, 右为融合 PCR 获得的融合片段 $\beta a-GT$ 与 $GT-\beta a$ 约 4.5 kb, 且融合质粒上下游测序结果与 NCBI-GenBank 进行匹配一致性为 100%, 说明序列正确。在 β -amylase- $GTase$ 融合中, β -amylase 的 C 端与 $GTase$ 的 N 端融合, $GTase$ - β -amylase 的融合方式与之相反。Linker 序列的加入目的是加快重组 DNA 的构建, 且不删除任何氨基酸, 插入的片段表达的氨基酸为 LGSRSAEL^[15]。

融合质粒在 *E. coli* 胞内表达蛋白 SDS-PAGE

分析如图 3 所示, Lanes 1-2 为 β -amylase- $GTase$ 蛋白, Lanes 3 和 4 为 $GTase$ - β -amylase 蛋白, 去掉 pET32b 自身载体蛋白后大小约为 170 kDa, 与理论值相一致。

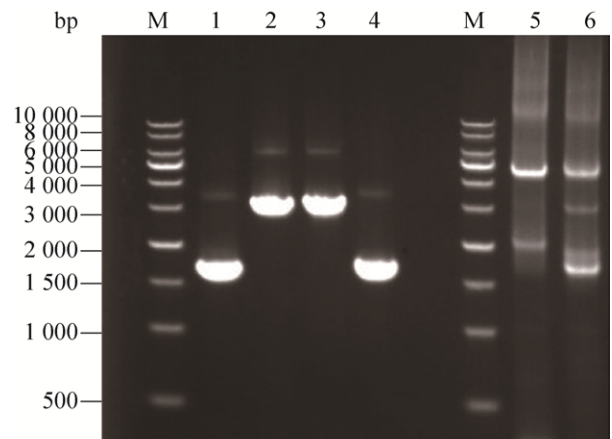


图 2 $\beta a-GT$ 和 $GT-\beta a$ 基因扩增

Fig. 2 DNA gel electrophoresis of $\beta a-GT$ and $GT-\beta a$ gene. Lanes 1-2: two parts PCR product of $\beta a-GT$, β -amylase and $GTase$; lanes 3-4: two parts PCR product of $GT-\beta a$, $GTase$ and β -amylase; lanes 5-6: the whole PCR product of $\beta a-GT$ and $GT-\beta a$.

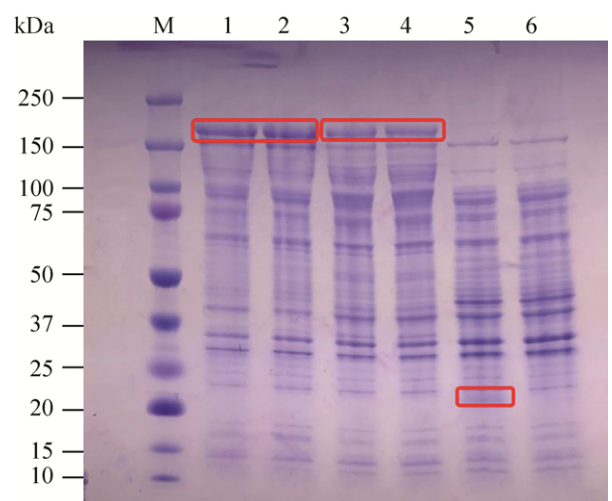


图 3 *E. coli* 表达 $\beta a-GT$ 和 $GT-\beta a$ 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE of the fusion protein $\beta a-GT$ and $GT-\beta a$. Lanes 1-2, 3-4, 5: the supernatant (soluble proteins) of *E. coli* containing pET32b- $\beta a-GT$, pET32b- $GT-\beta a$ and pET32b; lane 6: the supernatant (soluble proteins) of *E. coli*.

2.2 *Y. lipolytica* 工程菌合成 IMO

2.2.1 含 β -amylase 与 *GTase* 单基因的酵母展示菌株 $Y_{\beta a}$ 和 Y_{GT} 的选择

经过潮霉素抗性平板筛选得到约 300 个转化子, 选取 50 个较大的转化子进一步纯化, PCR 验证获得阳性克隆 30–40 个不等。转化子进行底物转化实验, 根据转化效率选出最优转化子。如图 4A 所示, 32 个 $Y_{\beta a}$ 转化子中有 10 个转化子与空白对照相同, 未表现出活性, 其他由底物可溶性淀粉可产生约 62% 麦芽糖产率, 选出最优转化子 $Y_{\beta a19}$, 其酶活力为 0.03 U/mg。通过对 Y_{GT} (图 4B) 共 40 个转化子添加底物 40% 麦芽糖溶液反应检测, 除了 5 个转化子只表现出水解酶活性, 即将麦芽糖水解产生葡萄糖外, 其他均有 IMO 产生, 产率在 30% 上下浮动, 选出最优转化子 Y_{GT7} , 其酶活力约为 0.023 U/mg。

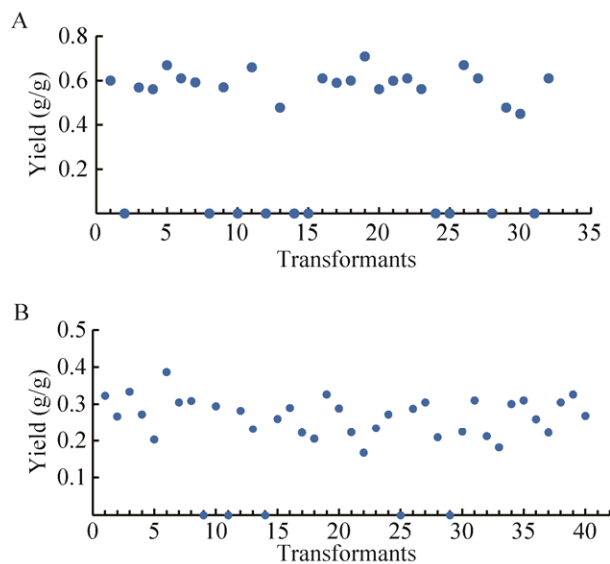


图 4 不同酵母转化子转化淀粉或麦芽糖合成产物的差异分析

Fig. 4 Comparative analysis of different *Y. lipolytica* transformants. (A) Yields were obtained when various $Y_{\beta a}$ transformants converting 3% soluble starch to maltose. (B) Yields were obtained when various Y_{GT} transformants converting 40% maltose to IMO.

2.2.2 含 βa -*GT* 和 *GT*- βa 融合基因的酵母展示菌株 $Y_{GT-\beta a}$ 和 $Y_{\beta a-GT}$ 的选择与表达差异

含融合基因酵母展示菌株经多次纯化获得稳定遗传转化子, 对于 $Y_{GT-\beta a}$, 经多次转化获得不同批次转化子约 100 个均进行了底物转化实验, 未见反应, 怀疑是 *GTase* 基因先表达影响了整体的活性。

对于 $Y_{\beta a-GT}$, 选取 30 个转化子以 3% 可溶性淀粉溶液作为底物的产物组成见图 5A, 不同的转化子产物表现各异, 除去无反应的和只有麦芽糖一种产物的转化子, 有 10 个转化子的产物中观测到了麦芽糖与葡萄糖, 且葡萄糖占比约为麦芽糖的 2 倍; 有 11 个在产物中只观测到了葡萄糖, 约占 43% (淀粉不能完全转化, 有一部分底物残留)。由此可认为此 21 个转化子是两个基因均发挥了作用, 首先 β -淀粉酶将淀粉水解产生麦芽糖, 而耐热 α -葡萄糖苷酶对于低浓度的麦芽糖转苷酶活性较弱, 主要发挥了水解酶的活性, 将得到的麦芽糖进一步水解产生葡萄糖。挑选其中的转化子以麦芽糖作为底物实验得到的结果与单个 Y_{GT7} 菌株基本无异 (图 5B), 证明了 $Y_{\beta a-GT}$ 融合菌株的确是两个基因均可以表达, 选出最优转化子 $Y_{\beta a-GT29}$ 。

2.2.3 不同转化子合成 IMO 的差异可能是由于外源基因插入染色体的位置不同而造成的

以上转化子经 PCR 验证基因组中均含有相应目的基因表达盒, 但是不同的转化子底物合成产物的性能存在较大的差异。图 4A 中第 19 号含 β -amylase 基因的转化子 ($Y_{\beta a19}$), 由可溶淀粉转化生成麦芽糖产率为 71%, 而有的转化子虽然含有目的基因却不能合成 IMO。对于含 *GTase* 基因的转化子 (图 4B) 以及含融合基因 βa -*GT* 的转化子 (图 5A) 情况类似, 不同转化子合成产物的性能差距很大。产生这种现象的原因可能是表达盒虽然整合到了 *Y. lipolytica* 基因组中, 但其表达差异很大。我们选取了 3 个均含有 β -amylase 基因的转化子 ($Y_{\beta a2}$ 、 $Y_{\beta a13}$ 、 $Y_{\beta a19}$) 提取总 RNA, 反转录

进行 β -amylase 基因表达水平荧光定量分析,发现 $Y_{\beta a2}$ 转化子的 β -amylase 基因相对表达水平为 0, 即没有得到表达, $Y_{\beta a19}$ 的相对表达水平为 4.2, $Y_{\beta a13}$ 的相对表达水平为 1.7, 与产物产率相一致。因此可以看出, 虽外源基因均整合到基因组中, 但由于其表达水平的差异而导致不同转化子的转化性能差异。产生这些差异的根本原因很可能是基因插入到基因组中的位置效应而导致的。染色体中有的位置基因活跃, 而有的位置沉默, 外源基因所处的位置对于其表达水平至关重要。Wu 等^[18]利用荧光蛋白作为标记研究了酿酒酵母 6 条染色体中的不同的位置对于荧光蛋白基因的表达水平的影响, 发掘了一批活跃表达与沉默的位置, 为外源基因在酿酒酵母中的表达奠定了基础。因此, 为了获得外源基因的最高水平的表达, 应该将外源基因插入到染色体的活跃区域。

2.3 *E. coli* 工程菌合成 IMO

2.3.1 含 β -amylase 与 *GTase* 单基因的大肠杆菌菌株 $E_{\beta a}$ 和 E_{GT} 合成麦芽糖与 IMO 的性能

为比较酵母与大肠杆菌细胞的表达差异, 将单个基因利用载体 pET32b 在 BL21 (DE3) 表达宿主内表达。值得注意的是, E_{GT} 菌株在添加麦芽糖作为底物后, 完全没有产物 IMO 产生, 原因可

能是 *GTase* 基因为真菌米曲霉的基因, 在大肠杆菌中不能正确折叠因而没有活性。含 β -amylase 基因的 $E_{\beta a}$ 细胞转化淀粉的效率反而大幅度提高, 如图 6, 在加入底物的瞬间即能检测到麦芽糖产物的产生, 20 min 时已有 60.5% 麦芽糖产生, 其酶活为 0.398 U/mg, 为酵母展示菌株的 13.3 倍, 可用作由淀粉生产麦芽糖的工程菌株。

2.3.2 含 β -GT 和 *GT*- β 融合基因的 *E. coli* 菌株 $E_{GT-\beta a}$ 和 $E_{\beta a-GT}$ 合成 IMO 的性能

含 β -淀粉酶与 α -葡糖糖转苷酶基因的酵母菌株 $Y_{\beta a-GT}$ 具有良好活性 (图 5), 能将液化的淀粉转化为 IMO。而对于含 β -淀粉酶与 α -葡糖糖转苷酶基因的 *E. coli* 菌株, 不同融合方式的 $E_{GT-\beta a}$ 、 $E_{\beta a-GT}$ 菌株均能转化可溶性淀粉生成麦芽糖, 表明 $E_{GT-\beta a}$ 、 $E_{\beta a-GT}$ 菌株的 β -amylase 基因均能表达成具有活性的淀粉酶; 但是均不能转化麦芽糖生成 IMO, 表明 *GTase* 基因虽然能得到融合表达 (图 3), 但是无活性, 与单基因 *GTase* 在大肠杆菌内表达的结果相符。值得注意的是, β -淀粉酶基因与 α -葡糖糖转苷酶基因以 *GTase*- β -amylase 顺序在酵母中融合表达时, 这两个基因均未表现出活性, 而在大肠杆菌中融合表达时, β -amylase 有活性, 而 *GTase* 没有活性。

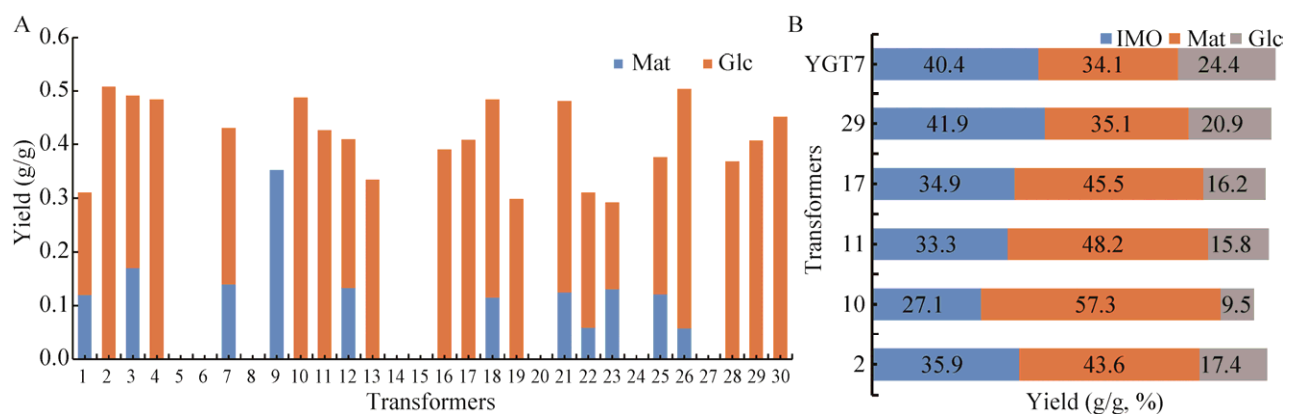


图 5 选取不同的酵母转化子转化淀粉合成产物的分析

Fig. 5 Comparative analysis of different *Y. lipolytica* transformants. (A) Yield of products by the $Y_{\beta a-GT}$ transformants with the 3% starch. (B) Yield of products by the $Y_{\beta a-GT}$ 2,10,11,17, 29 transformants and Y_{GT} with the 40% maltose.

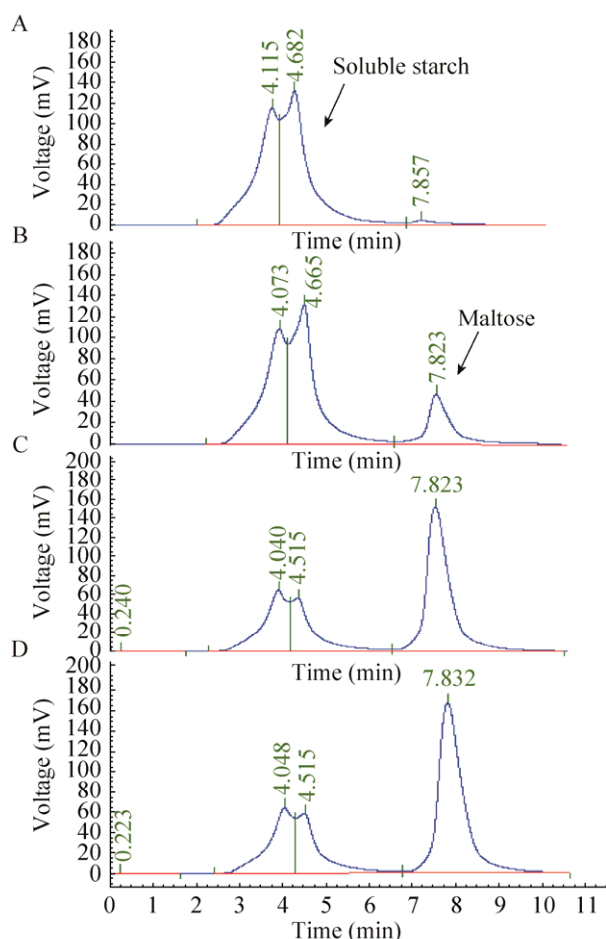


图6 大肠杆菌 $E_{\beta a}$ 转化可溶性淀粉时产物生成色谱图
Fig. 6 HPLC analysis of maltose products by *E. coli* $E_{\beta a}$ cells with soluble starch. (A) 0 min. (B) 5 min. (C) 20 min. (D) 40 min.

2.3.3 不同的基因融合顺序对表达的酶活性的影响

将基因进行融合共同表达成为多功能融合酶，在蛋白质工程中具有很大的潜力。融合酶由于其物理邻近效应^[19]，可以通过促进反应中间体转移到下一种酶的活性位点使得融合酶催化的反应速率大幅度提高，该技术已经在海藻糖以及长链低聚异麦芽糖的合成得到应用^[15,20-21]。也可以使用两种展示蛋白将两个酶进行共展示在细胞表面，但融合酶由于更加邻近，因而在反应中间体

的转移过程中可更快速到达下一个酶，反应效率更高。

本研究将合成低聚异麦芽糖的两种关键酶 β -淀粉酶基因与 α -葡萄糖苷酶基因进行融合，在 *Y. lipolytica* 中进行表面展示表达以及在 *E. coli* 中进行胞内表达。有趣的是，融合基因在酵母表面展示表达时，基因的不同融合顺序对酶的活性具有很大的差异。当以 β -amylase-GTase 的先后顺序进行融合表达时，两种酶均有活性；而当以 GTase- β -amylase 的先后顺序在酵母表面进行融合表达时，均未发现有催化活性。然而，当融合基因在大肠杆菌进行胞内融合表达时，无论以哪种融合顺序 (GTase- β -amylase 或 β -amylase-GTase)，发现 β -amylase 均有催化活性，而 GTase 均无活性 (表 2)。造成这种酶活性因融合顺序不同而不同的原因，很可能是融合顺序影响了 GTase 的正确折叠。无论是 GTase- β -amylase 或 β -amylase-GTase 融合方式，在大肠杆菌中 GTase 均不能正确折叠，即使能够表达也没有活性。而 β -amylase 能够正确折叠，从而在这两种不同的融合方式中均表现出活性。因此，在进行酶融合表达研究时，需要对不同的融合顺序研究，以确定最佳的融合方式。

2.4 一步法合成 IMO

将优选出的 $Y_{\beta a-GT29}$ 酵母菌株培养获得大量细胞，使用液化的玉米淀粉作为底物。根据玉米

表2 *Y. lipolytica* 和 *E. coli* 中基因表达活性情况汇总表
Table 2 The outline of genes expression in *Y. lipolytica* and *E. coli*

Genes	Expressed enzymes	<i>Y. lipolytica</i>	<i>E. coli</i>
β -amylase	β -amylase	+	+
GTase	GTase	+	-
β -amylase-GTase	β -amylase	+	+
(fused)	GTase	+	-
GTase- β -amylase	β -amylase	-	+
(fused)	GTase	-	-

(+):active; (-):inactive.

淀粉液化时间图谱分析选定 15 min 为最适液化时间, 图 7 中 A、B、C、D 为添加 $Y_{\beta\text{-GT}29}$ 细胞在 50 °C 反应时所得产物的 HPLC 分析图, 淀粉被转化生成低聚葡萄糖。用色谱柱 Shodex DC613、乙腈作为流动相将 7 D 产物进行分析, 可清晰看出各低聚糖的含量 (图 8A)。将异麦芽糖、潘糖、异麦芽三糖、异麦芽四糖及以上的寡糖归为 IMO, 可占总产物的 75.3%, 即 200 g/L 玉米淀粉最终可产 150.6 g/L IMO。转化过程中 IMO 各组分含量随时间变化见图 8B, 麦芽糖在 7 h 后开始减少, 慢慢转化成其他低聚糖。

如前言所说, 低聚异麦芽糖目前通过淀粉以多酶有序进行转化合成, 步骤较多, 操作比较复杂, 增加了生产成本。由于 α -葡萄糖转苷酶是合成低聚异麦芽糖的关键酶, 也是成本较高的酶之一, 为了减少该酶的成本, 有人研究采用化学戊二醛酶固定化的方式增加转苷酶的使用次数^[22-23], 但是当酶失效后, 产生大量的固定化介质废弃物难以处理或增加废弃物处理成本。而采用本研究开发的双酶融合共表达并展示固定在酵母表面的方法, 能够减少酶纯化的成本, 无需化学固定酶的步骤, 展示的酶能够多次反复利用。当酶失效后, 酵母细胞仍然能够制成酵母干粉或者酵母浸膏, 当成培养基使用, 整个过程持续循环, 绿色环保, 基本无废弃物排放 (Waste-Zero)。

解脂耶氏酵母 *Y. lipolytica* 是一种研究最广泛的酵母之一, 被美国食品药品监督管理局认定为公认安全的食品微生物, 已经在食品工业得到广泛的应用, 如合成有机酸、赤藓糖醇、 Ω -3 多不饱和脂肪酸 (如二十碳五烯酸 EPA)、 β -胡萝卜素等^[24-28]。我们研究小组利用该酵母作为微生物细胞工厂, 将果糖基转移酶、半乳糖基转移酶、海藻糖合成酶以及异麦芽酮糖合成酶表面展示在解脂耶氏酵母细胞表面, 分别得到合成低聚果糖、

低聚半乳糖、海藻糖以及异麦芽酮糖的工程菌株^[29-32]。本研究将 β -淀粉酶与 α -葡萄糖转苷酶进行融合, 同时表面展示在解脂耶氏酵母细胞上, 对转化子进行筛选得到一株由液化淀粉为底物一步法合成低聚异麦芽糖的菌株 $Y_{\beta\text{-GT}29}$, 转化率达到 75.3%, 为工业合成 IMO 提供了一种新的方法。

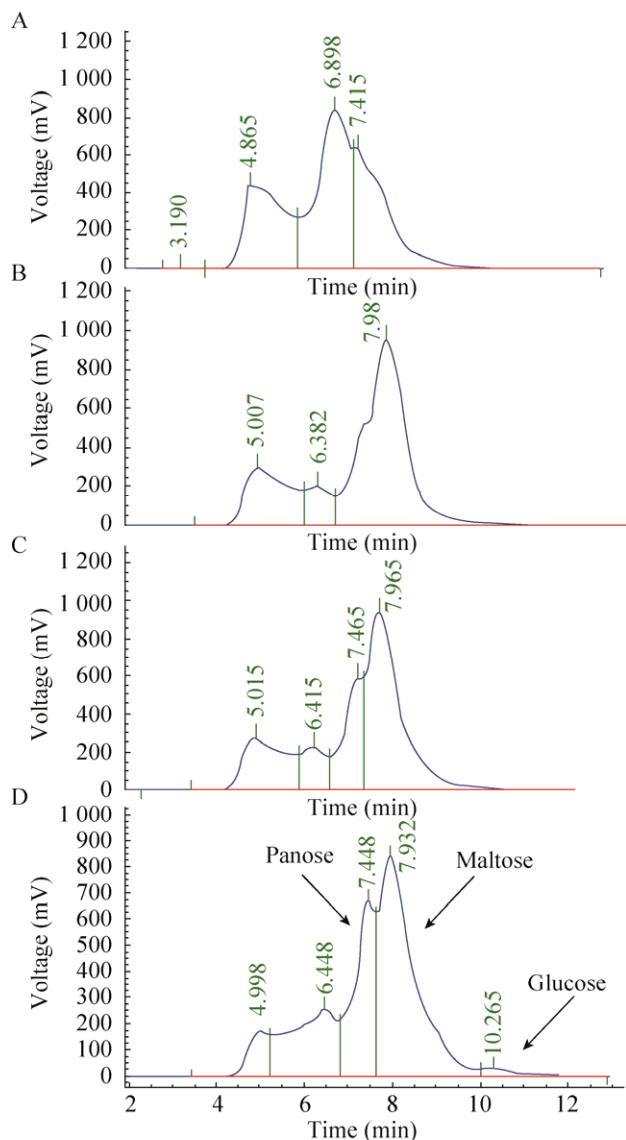


图 7 $Y_{\beta\text{-GT}29}$ 细胞转化玉米淀粉液化液生成产物的色谱图

Fig. 7 HPLC analysis of products obtained by $Y_{\beta\text{-GT}29}$ cells with the liquefied maize starch. (A) 0 h. (B) 5 h. (C) 10 h. (D) 20 h.

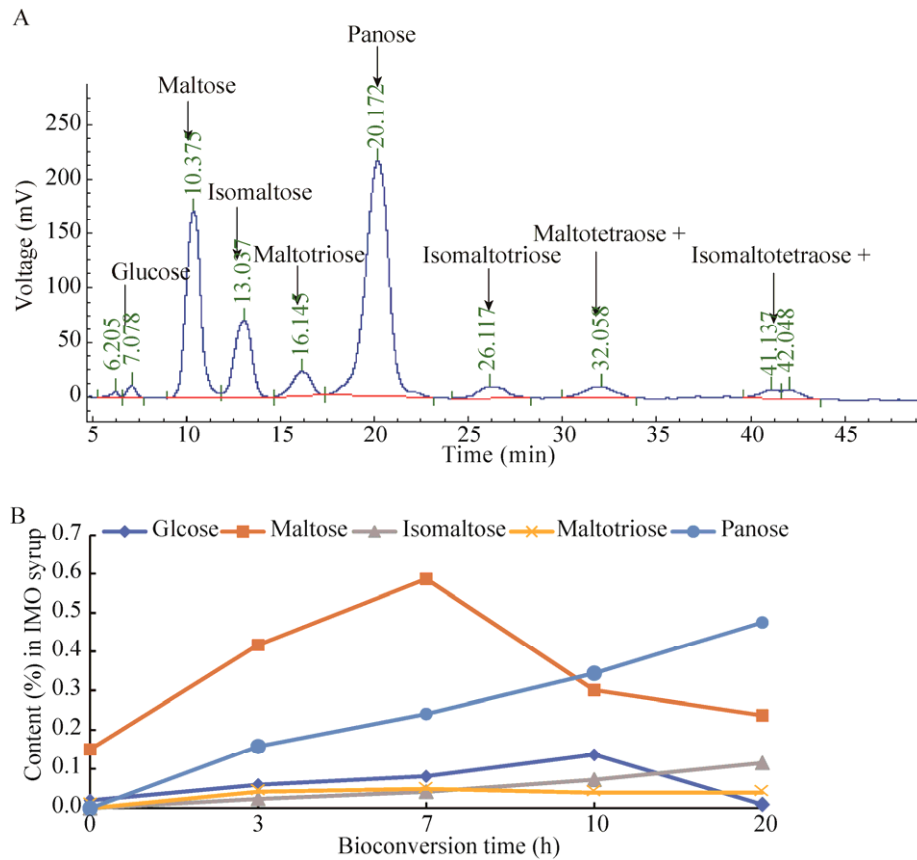


图 8 $Y_{\beta a-GT29}$ 细胞转化玉米淀粉液化液的 IMO 各组份色谱图 (A) 及时间变化图 (B)

Fig. 8 HPLC analysis of carbohydrates in the IMO syrup obtained by $Y_{\beta a-GT29}$ cells with the liquefied maize starch (A) and changes in the content during the bioconversion time (B).

REFERENCES

- [1] Goffin D, Wathelet B, Blecker C, et al. Comparison of the glucooligosaccharide profiles produced from maltose by two different transglucosidases from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Agronom Soci Environ*, 2010, 14(4): 607–616.
- [2] Konishi Y, Shindo K. Production of nigerose, nigerosyl glucose, and nigerosyl maltose by *Acremonium* sp. S4G13. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61(3): 439–442.
- [3] Florowska A, Krygier K, Florowski T, et al. Prebiotics as functional food ingredients preventing diet-related diseases. *Food Funct*, 2016, 7(5): 2147–2155.
- [4] Yen CH, Tseng YH, Kuo YW, et al. Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people—A placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition*, 2011, 27(4): 445–450.
- [5] Swennen K, Courtin CM, Delcour JA. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Crit Rev Food Sci Nutrit*, 2006, 46(6): 459–471.
- [6] Panesar PS, Kumari S, Panesar R. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 33(4): 345–364.
- [7] Goffin D, Delzenne N, Blecker C, et al. Will isomalto-oligosaccharides, a well-established functional food in Asia, break through the European and American market? The status of knowledge on these prebiotics. *Crit Revi Food Sci Nutrit*, 2011, 51(5): 394–409.
- [8] Kim YW, Choi JH, Kim JW, et al. Directed evolution of *Thermus* maltogenic amylase toward enhanced thermal resistance. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4866–4874.
- [9] Pan YC, Lee WC. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 89(7): 797–804.
- [10] Lin QL, Xiao HX, Zhao J, et al. Production of

- isomalto-oligosaccharide syrup from rice starch using an one-step conversion method. *Int J Food Sci Technol*, 2011, 46(6): 1194–1200.
- [11] Kitamoto N, Yamagata H, Kato T, et al. Cloning and sequencing of the gene encoding thermophilic β -amylase of *Clostridium thermosulfurigenes*. *J Bacteriol*, 1989, 170(12): 5848–5854.
- [12] Nicaud JM, Madzak C, Van Den Broek BP, et al. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res*, 2002, 2(3): 371–379.
- [13] Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods*, 2003, 55(3): 727–737.
- [14] Nakamura A, Nishimura I, Yokoyama A, et al. Cloning and sequencing of an α -glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans*. *J Biotechnol*, 1997, 53(1): 75–84.
- [15] Wang JH, Tsai MY, Lee GC, et al. Construction of a recombinant thermostable β -amylase-trehalose synthase bifunctional enzyme for facilitating the conversion of starch to trehalose. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(4): 1256–1263.
- [16] Chen DC, Beckerich JM, Gaillardin C. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(2): 232–235.
- [17] Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(1): 55–59.
- [18] Wu XL, Li BZ, Zhang WZ, et al. Genome-wide landscape of position effects on heterogeneous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bio*, 2017, 10(1): 189.
- [19] Meek TD, Garvey EP, Santi DV. Purification and characterization of the bifunctional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase from methotrexate-resistant *Leishmania tropica*. *Biochemistry*, 1985, 24(3): 678–686.
- [20] de Pascale DP, Di Lernia I, Sasso M, et al. A novel thermophilic fusion enzyme for trehalose production. *Extremophiles*, 2002, 6(6): 463–468.
- [21] Ryu HJ, Jin XJ, Lee JH, et al. Optimal expression and characterization of a fusion enzyme having dextranucrase and dextranase activities. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 47(5): 212–215.
- [22] Zhang L, Jiang YJ, Jiang ZY, et al. Immobilized transglucosidase in biomimetic polymer-inorganic hybrid capsules for efficient conversion of maltose to isomaltooligosaccharides. *Biochem Eng J*, 2009, 46(2): 186–192.
- [23] Sheu DC, Huang CI, Duan KJ. Production of isomaltooligosaccharides by α -glucosidase immobilized in chitosan beads and by polyethyleneimine-glutaraldehyde treated mycelia of *Aspergillus carbonarius*. *Biotechnol Technol*, 1997, 11(5): 287–291.
- [24] Finogenova TV, Morgunov IG, Kamzolova SV, et al. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. *Appl Biochem Microbiol*, 2005, 41(5): 418–425.
- [25] Xue ZX, Sharpe PL, Hong SP, et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 734–740.
- [26] Cheng HR, Lv JY, Wang B, et al. *Yarrowia lipolytica* strain and method thereof for synthesizing erythritol: CN, 103374534 A[P]. 2013 (in Chinese). 程海荣, 吕霁焯, 王犇, 等. 解脂亚罗酵母菌株及其用于合成赤藓糖醇的方法: CN, 103374534A[P]. 2013.
- [27] Wang SQ, Wang HW, Lv JY, et al. Highly efficient erythritol recovery from waste erythritol mother liquor by a yeast-mediated biorefinery process. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(50): 11020–11028.
- [28] Gao SL, Tong YY, Zhu L, et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production. *Metabol Eng*, 2017, 41: 192–201.
- [29] Zhang LB, An J, Li LJ, et al. Highly efficient fructooligosaccharides production by an erythritol-producing yeast *Yarrowia lipolytica* displaying fructosyltransferase. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(19): 3828–3837.
- [30] An J, Zhang LB, Li LJ, et al. An alternative approach to synthesizing galactooligosaccharides by cell-surface display of β -galactosidase on *Yarrowia lipolytica*. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(19): 3819–3827.
- [31] Li N, Wang HW, Li LJ, et al. Integrated approach to producing high-purity trehalose from maltose by the yeast *Yarrowia lipolytica* Displaying Trehalose Synthase (TreS) on the cell surface. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(31): 6179–6187.
- [32] Li LJ, Wang HW, Cheng HR, et al. Isomaltulose production by yeast surface display of sucrose isomerase from *Pantoea dispersa* on *Yarrowia lipolytica*. *J Funct Foods*, 2017, 32: 208–217.

(本文责编 陈宏宇)