

发酵乳杆菌来源 L-阿拉伯糖异构酶理性设计及在 D-塔格糖生产中的应用

李娟^{1,2,3}, 吴敬^{1,2,3}, 陈晟^{1,2,3*}, 夏伟^{1,2,3*}

1 江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 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

3 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

李娟, 吴敬, 陈晟, 夏伟. 发酵乳杆菌来源 L-阿拉伯糖异构酶理性设计及在 D-塔格糖生产中的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 1107-1118.

LI Juan, WU Jing, CHEN Sheng, XIA Wei. Rational design of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* and its application in D-tagatose production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(3): 1107-1118.

摘要: L-阿拉伯糖异构酶(L-arabinose isomerase, L-AI)是 D-半乳糖异构化生成 D-塔格糖的关键酶。为提高 L-阿拉伯糖异构酶对 D-半乳糖的活性及在生物转化中的转化率, 本研究对发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*) CGMCC2921 来源的 L-阿拉伯糖异构酶进行重组表达和生物转化应用, 并对其底物结合口袋进行理性设计以提高酶对 D-半乳糖亲和力和催化活性。结果显示, 突变体 F279I 对 D-半乳糖的转化率提高至野生型酶的 1.4 倍, 进一步叠加获得的双突变体 M185A/F279I 的 K_m 和 k_{cat} 分别为 530.8 mmol/L 与 19.9 s⁻¹, 底物亲和力显著提高, 催化效率提高至野生型酶的 8.2 倍。以 400 g/L 乳糖为底物时, 突变酶 M185A/F279I 转化率高达 22.8%。本研究在乳糖高值化生产塔格糖方面具有重要的应用价值。

关键词: L-阿拉伯糖异构酶; 理性设计; D-半乳糖; D-塔格糖; 转化率

资助项目: 国家自然科学基金(31801472, 31730067); 江苏省自然科学基金(BK20180604)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31801472, 31730067) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20180604).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Sheng, chensheng@jiangnan.edu.cn; XIA Wei, weixia@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-10-07; Accepted: 2023-01-07

Rational design of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* and its application in D-tagatose production

LI Juan^{1,2,3}, WU Jing^{1,2,3}, CHEN Sheng^{1,2,3*}, XIA Wei^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

3 International Joint Laboratory on Food Safety, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: L-arabinose isomerase (L-AI) is the key enzyme that isomerizes D-galactose to D-tagatose. In this study, to improve the activity of L-arabinose isomerase on D-galactose and its conversion rate in biotransformation, an L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 was recombinantly expressed and applied in biotransformation. Moreover, its substrate binding pocket was rationally designed to improve the affinity and catalytic activity on D-galactose. We show that the conversion of D-galactose by variant F279I was increased 1.4 times that of the wild-type enzyme. The K_m and k_{cat} values of the double mutant M185A/F279I obtained by superimposed mutation were 530.8 mmol/L and 19.9 s⁻¹, respectively, and the catalytic efficiency was increased 8.2 times that of the wild type. When 400 g/L lactose was used as the substrate, the conversion rate of M185A/F279I reached a high level of 22.8%, which shows great application potential for the enzymatic production of tagatose from lactose.

Keywords: L-arabinose isomerase; rational design; D-galactose; D-tagatose; conversion rate

D-塔格糖是一种稀有己糖, 2001 年被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)纳入普遍公认安全食品(generally recognized as safe, GRAS)名单^[1]。塔格糖具有许多重要的生理功能, 如低消化率、抗龋齿^[2]、改善肠道菌群^[3]、促进血液健康^[4-5]、增加高密度脂蛋白胆固醇含量等^[6], 其甜度是蔗糖的 92%^[7], 热量较低(1.5 kcal/g 塔格糖 vs. 4 kcal/g 蔗糖), 对血糖水平几乎没有影响^[8], 是一种优良的低热量甜味剂。随着我国国民生活水平提高和健康意识逐渐增强, 塔格糖作为一种新型的低热量代糖, 具有广阔的市场前景。如今我国开始尝试大规模生产, 但是由于尚未摸索到优良的生产方法和合适的酶制剂, 导致产量低。

塔格糖的制备方法有化学合成法与生物合成法两种。化学法存在副产物的形成、苛刻的

条件和经济上的不可行性的缺点^[9]而不被采用。生物合成主要以乳糖为原料, 经 β -半乳糖苷酶(乳糖酶)水解得到半乳糖, 再经 L-阿拉伯糖异构酶(L-arabinose isomerase, L-AI)异构化生成塔格糖^[10], 其反应如图 1 所示。整个反应过程具有反应条件温和、清洁、低碳、催化特异性强等优点^[11]。Cheetham 等^[12]首次报道微生物来源 L-AI 可以催化 D-半乳糖异构化为 D-塔格糖。许多研究相继报道了来自不同微生物的 L-AI, 如热脱氮土芽孢杆菌(*Bacillus pyrodenitrium*)^[10]、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)^[13]、副布氏乳杆菌(*Lactobacillus parabuchneri*)^[14]、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)^[15]、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)^[16]、戊糖葡萄球菌(*Pediococcus pentosaceus*)^[17]等, 并将其用于制备塔格糖。

现阶段 L-AI 制备 D-塔格糖主要存在两个不足:一是 L-AI 的天然底物为 L-阿拉伯糖(戊糖),与非天然底物 D-半乳糖(己糖)结合时,底物 C6 处存在空间位阻,导致亲和性差、催化效率和转化率低;二是 L-AI 在食品级表达中的研究较为欠缺。如今,转化率和食品级安全表达制约着 D-塔格糖的产业化。

本研究将发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*) CGMCC2921 来源 LfAI 在枯草芽孢杆菌中进行了异源表达,并对 LfAI 和商品乳糖酶协同催化制备塔格糖的反应条件进行了优化。在此基础上,对 LfAI 底物结合口袋进行理性设计,成功提高了 LfAI 对 D-半乳糖的转化率。

1 材料与方 法

1.1 材料

本研究所用 pHY300PLK 载体,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WS9 宿主菌均由本实验室构建保存。LfAI (GenBank 登录号:WP-012391619.1)编码的 *araA* 基因经密码子优化后由苏州安升达有限公司化学合成。DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自康为科技(北京)有限公司;PCR 所用试剂盒购自南京诺唯赞生

物科技有限公司;D-半乳糖、D-塔格糖标准品购自 Sigma-Aldrich 公司;乳糖酶购自夏盛(北京)生物科技开发有限公司;其余试剂购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 重组质粒构建、表达和纯化

重组质粒构建:以 pET-24a(+)-*LfAI* 为 PCR 模板,设计引物 *araA*-F/R (表 1)扩增基因 *araA*。以 pHY300PLK 空载为模板,设计引物 F 和 R 扩增 pHY300PLK 载体。两者 PCR 产物均用琼脂糖凝胶电泳验证,并进行产物回收。通过一步克隆试剂盒将目的基因 *LfAI* 与 pHY300PLK 载体相连接以构建重组质粒 pHY300PLK-*LfAI*,测序验证正确后将重组质粒电转转化至菌株 *B. subtilis* WS9。

定点突变:以 pHY300PLK-*LfAI* 质粒为模板,设计各引物(表 1)。25 μ L PCR 反应体系进行 PCR 扩增,PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 5 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 8 min,PCR 反应结束后加入取 10 μ L 产物加入 0.5 μ L *Dpn* I,37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h 消除 PCR 产物中的模板成分,热激法转入大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞,进行测序鉴定正确后电转化至菌株 *B. subtilis* WS9。

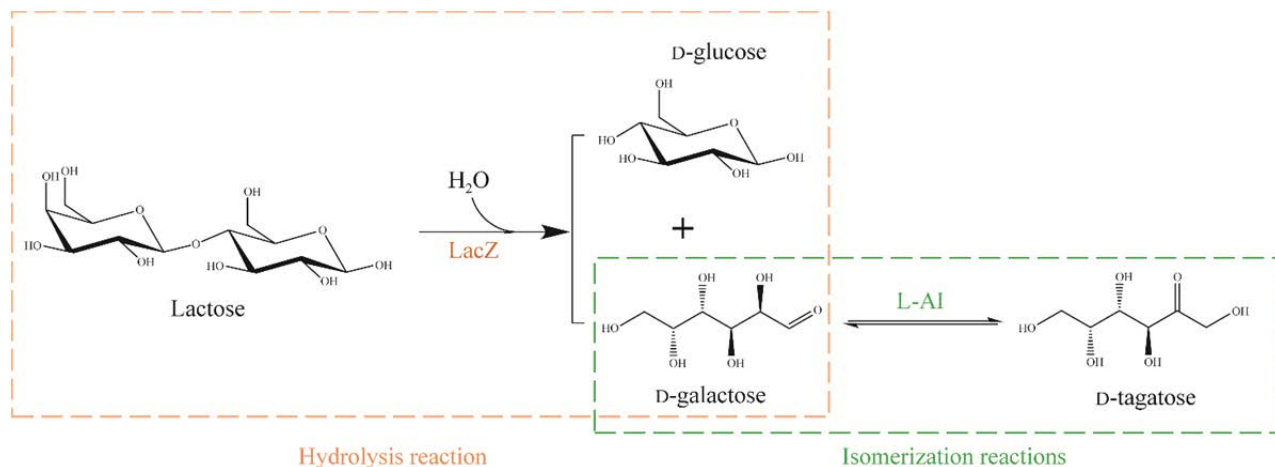


图 1 双酶反应示意图

Figure 1 Schematic diagram of the double enzyme reaction.

表 1 定点突变引物设计

Table 1 The primers designed for mutagenesis

Primer	Primer sequence (5'→3')
F	AAGCTTGGTAATAAAAAACACCTCCR
R	TCTTGACACTCCTTATTTGATTTTTTG
<i>araA</i> -F	AATAAGGAGTGTCAAGACATATGAGAAAAATGCAAGATTATAAATTTTGG
<i>araA</i> -R	TTTTTATTACCAAGCTTAAGCTTTTAATGATGGTGATGGTGATG
F279I	ATGCATTTACAGATAAT <u>ATT</u> CAAGATCTTGAAGGCCT
F279N	ATGCATTTACAGATAAT <u>AAT</u> CAAGATCTTGAAGGCCT
F279V	ATGCATTTACAGATAAT <u>GTT</u> CAAGATCTTGAAGGCCT
M185A	CAAGATTTGGCGATACAG <u>CA</u> AGAGATGTTGCAGTTAC
M185N	CAAGATTTGGCGATACAA <u>AT</u> AGAGATGTTGCAGTTAC
I370F	AAGTTCATCCGCTGGGC <u>TTT</u> GGCGGCAAAGATGATCC
I370Q	AAGTTCATCCGCTGGGC <u>CAA</u> GGCGGCAAAGATGATCC
I370A	AAGTTCATCCGCTGGGC <u>GCA</u> GGCGGCAAAGATGATCC
N122I	TTGATATGGATTATATG <u>ATT</u> CTGCATCAATCAGCACA
V188N	GGCGATAACAATGAGAGAT <u>AAT</u> GCAGTTACAGAAGGCG
V188A	GGCGATAACAATGAGAGAT <u>GCA</u> GCAGTTACAGAAGGCG
V188D	GGCGATAACAATGAGAGAT <u>GAT</u> GCAGTTACAGAAGGCG
M118F	CGTTTGATTCAATTGAT <u>TTT</u> GATTATATGAATCTGCA
M118Y	CGTTTGATTCAATTGAT <u>TAT</u> GATTATATGAATCTGCA
M349Q	CAATTATGGGCTCACAC <u>CAA</u> CTGGAAGTTGATCCGAC

Only the forward primers were listed, and sequences corresponding to the mutated residues were underlined.

重组菌株的摇瓶发酵：取 20 μ L 甘油菌接种至 10 mL 液体 LB 培养基(Tet., 30 μ g/mL)中，37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后按 5% 的转接量转接至 TB 培养基(Tet., 30 μ g/mL)，37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 2 h 后调节培养温度至 33 $^{\circ}$ C 发酵 48 h。发酵液 8 000 r/min 离心 15 min 后用磷酸盐缓冲液(pH 6.5, 50 mmol/L)重悬细胞，用高压均质机粉碎，粉碎后的菌液 8 000 r/min 离心 20 min，保留上清液。

LfAI 及突变体纯化：使用镍离子亲和层析柱纯化 C 端带组氨酸标签(His-tag)的 LfAI 及突变体粗酶液。首先，用缓冲液 A (25 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.2–7.4)平衡 Ni-NTA 柱，粗酶液经 0.22 μ m 滤器过滤后在低流速下上样，收集流穿液。然后，使用不同咪唑浓度的缓冲液 B (25 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 30–300 mmol/L 咪唑)进行洗脱，收集流穿

液和洗脱液进行 SDS-PAGE 分析，确定洗脱条件以获得纯化蛋白^[18]。用磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 6.5)将纯化的酶液进行超滤置换除去酶液中高浓度的咪唑。

1.3 酶学性质测定

1.3.1 酶活测定方法

反应体系：1 mL 的反应体系中有 150 g/L D-半乳糖、适当酶液和 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 6.5)，其中分别以 1 mmol/L 和 2 mmol/L 的终浓度将 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 添加到反应混合物中^[19]，之后将反应混合物在 60 $^{\circ}$ C 下孵育 30 min，煮沸样品以终止酶反应。通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)来测定样品中的反应产物量。检测条件为：Agilent-Ca 色谱柱，超纯水为流动相，流速 0.5 mL/min，柱温 80 $^{\circ}$ C，示差检测器，检测温度 40 $^{\circ}$ C，进

样量 10 μL 。酶活定义：一个酶活力单位定义为每分钟催化生成 1 μmol D-塔格糖所需的酶量。

1.3.2 最适温度与最适 pH

最适温度：分别在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 、75 $^{\circ}\text{C}$ 、80 $^{\circ}\text{C}$ 下测定野生型和突变体的酶活。根据相对酶活计算公式计算对应条件下的相对酶活，确定野生型及突变体的最适反应温度。相对酶活=该反应条件下的实际酶活/最高酶活 $\times 100\%$ 。

最适 pH：分别配制 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0 的 D-半乳糖底物，在最适温度下按照上述方法测定不同 pH 下的酶活，将最高酶活定义为 100%。

1.4 双酶反应生产塔格糖条件确定

将乳糖(40%，质量体积比)与一定量的 LfAI 和乳糖酶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0 条件下进行酶转化，定期取样，将反应液煮沸 10 min 以终止反应。利用 HPLC 对反应液中的乳糖、葡萄糖、半乳糖以及塔格糖进行定量检测。根据初始反应条件(加酶量 1.4 mg/mL, pH 6.0)，选取 5 个温度(50 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 和 70 $^{\circ}\text{C}$)确定制备塔格糖的温度；选取 7 个 pH (5.0、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0)确定制备塔格糖的 pH。以同样的方式确定金属离子浓度、加酶量条件，最后确定制备塔格糖的底物浓度。

1.5 L-阿拉伯糖异构酶基因的定点突变与叠加突变

利用 LeDock 软件，以 LfAI (PDB ID: 4LQL) 为受体，D-半乳糖为配体进行分子对接。利用 LePro 处理准备好的受体蛋白质，设置均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值为 1.0，受体的活性位点通过原有晶体结构的配体直接生成，自动调整盒子大小，以立方体的一个最小顶点分别向 xyz 三个方向延伸，定义最大顶点，由此生成水盒子坐标文件。默认生成 20 个构象，从中选出结构和能量较好的构象分析 LfAI 与底物 D-半乳糖分子的相互作用，选择与底物结合相关或可能形成空间位阻的位点进行定点突变。

1.6 动力学参数的测定

为了确定 LfAI 野生型和突变体的动力学参数。按照 1.3.1 中酶活测定方法，使用不同浓度 D-半乳糖与酶在其最佳温度下孵育 30 min，通过 HPLC 检测。使用 Origin (2021)的非线性拟合分析获得 K_m 和 V_{max} ，结合拟合分析及蛋白分子量计算得到 k_{cat} 值。

2 结果与分析

2.1 重组酶基因的表达、纯化

LfAI 枯草芽孢杆菌表达菌株摇瓶发酵酶液 SDS-PAGE 结果见图 2A，在 44.3–66.2 kDa 之间

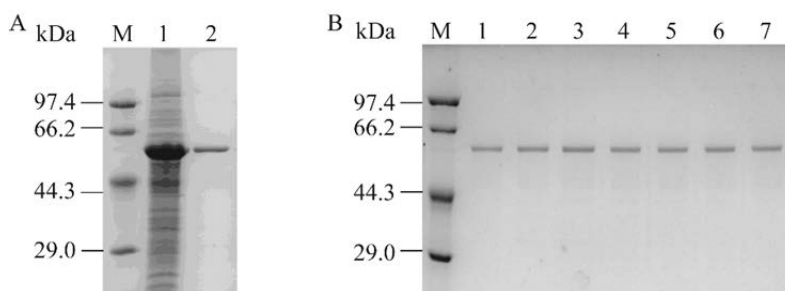


图 2 重组酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant LfAI. M: Marker; 1: Crude enzyme; 2: Purified wild-type LfAI (A). M: Marker; 1: Wild-type LfAI; 2: F279I; 3: M185A/F279I; 4: F279V; 5: M185A/F279V; 6: F279N; 7: M185A/F279N (B).

出现了一蛋白特征条带,与预期分子量 54.26 kDa 相符合。经镍柱纯化后获得单一目的蛋白条带。

2.2 双酶法酶转化反应体系的条件确定

双酶法制备塔格糖包括乳糖水解反应与半乳糖异构化反应。为了更好地发挥双酶共同作用时的最大效果,本研究对 LfAI 野生型与 β -半乳糖苷酶催化的 pH、温度、金属离子浓度(Mn^{2+} 与 Co^{2+})、反应时间、底物浓度以及加酶量等条件进行了单因素实验。

从图 3A 可以看出酶转化反应在 60 h 后塔格糖转化率趋于平衡,因此确定其最佳反应时间为 60 h。酶转化反应温度确定结果(图 3B)表明,在 55 °C 和 60 °C 条件下,60 h 时乳糖生成塔格糖反应转化率达到最高。鉴于温度过高可能会导致产物出现美拉德反应,所以后续反应温度选择 55 °C。徐铮等^[19]发现 D-半乳糖异构化过程中同时添加 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 极大地提高了 LfAI 活性。因此在双酶协同反应过程中,检测不同浓度的 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 对塔格糖转化率的影响,结果表明(图 3C),当体系中同时添加 1 mmol/L Mn^{2+} 和 1 mmol/L Co^{2+} 时,60 h 塔格糖转化率最高为 20.01%。有研究证明,弱酸性条件也有利于塔格糖的生成^[20]。乳糖水解(pH 5.0–7.0)和半乳糖异构化(pH 6.5–8.0)的最佳 pH 条件不同,因此需要对反应 pH 进行实验验证^[21]。当 pH 为 6.0 时,60 h 乳糖到塔格糖的转化率最高(图 3D),过酸或过碱都不利于塔格糖生成。随着加酶量的增加,转化率也随之提高(图 3E),但高加酶量会大幅度提高生产成本。图 3F 结果表明,以 400 g/L 乳糖为底物时,60 h 塔格糖转化率为 19.91% 达到最高,其产量随着底物浓度的增加而增加。

2.3 LfAI 定点突变选择及突变酶转化率分析

拟通过理性设计提高 L-阿拉伯糖异构酶

LfAI 制备塔格糖的转化率从而降低反应的加酶量以降低生产成本。通过分析 D-半乳糖与 LfAI 分子对接结果(图 4),发现底物活性中心附近 M185、F279、E306、E331、H348、I370、M118、H447 及 N122 与底物存在相互作用。其中 E306、E331、H348、H447 为确定的催化氨基酸,其余则为底物结合位点。因此选择与底物结合的残基进行突变研究,将 F279 突变为异亮氨酸(I)、缬氨酸(V)与 M185、I370 突变为丙氨酸(A)以减小空间位阻;将 I370 突变为苯丙氨酸(F),N122 突变为异亮氨酸(I)是将其极性作用力变为疏水相互作用;将 I370 突变为精氨酸(R),V188 突变为丙氨酸(A)、天冬氨酸(D)以及天冬酰胺(N),F279 突变为天冬酰胺(N)则是引入极性相互作用。

LfAI 野生型和突变体半乳糖异构化反应转化率如图 4B 结果所示,279 位点突变为侧链较小氨基酸的 3 个突变体均可以有效提高对 D-半乳糖转化率,分别是野生型的 1.3 倍、1.4 倍和 1.3 倍。此外,突变体 M185A 对 D-半乳糖转化率有略微提升至 37.2%。突变体 I370F、M118Y 与野生型转化率差别不明显。其余突变体的转化率明显下降。

2.4 优势突变体的酶学性质测定

2.4.1 最适温度和最佳 pH

在不同温度和 pH 条件下测定 LfAI 野生型(WT)和突变体的半乳糖异构化酶活,结果显示 F279N 最适温度为 60 °C,WT 与 F279I 最适温度为 70 °C,其余突变体的最适温度为 65 °C(图 5A);各突变体的最适 pH 均为 6.5(图 5B),与野生型一致,说明突变氨基酸并未影响活性位点的微环境^[22]。

2.4.2 与野生型的酶促反应动力学比较

279 位氨基酸突变对酶转化率提高效果最明显,185 位氨基酸次之(图 4B)。选择以 279 位

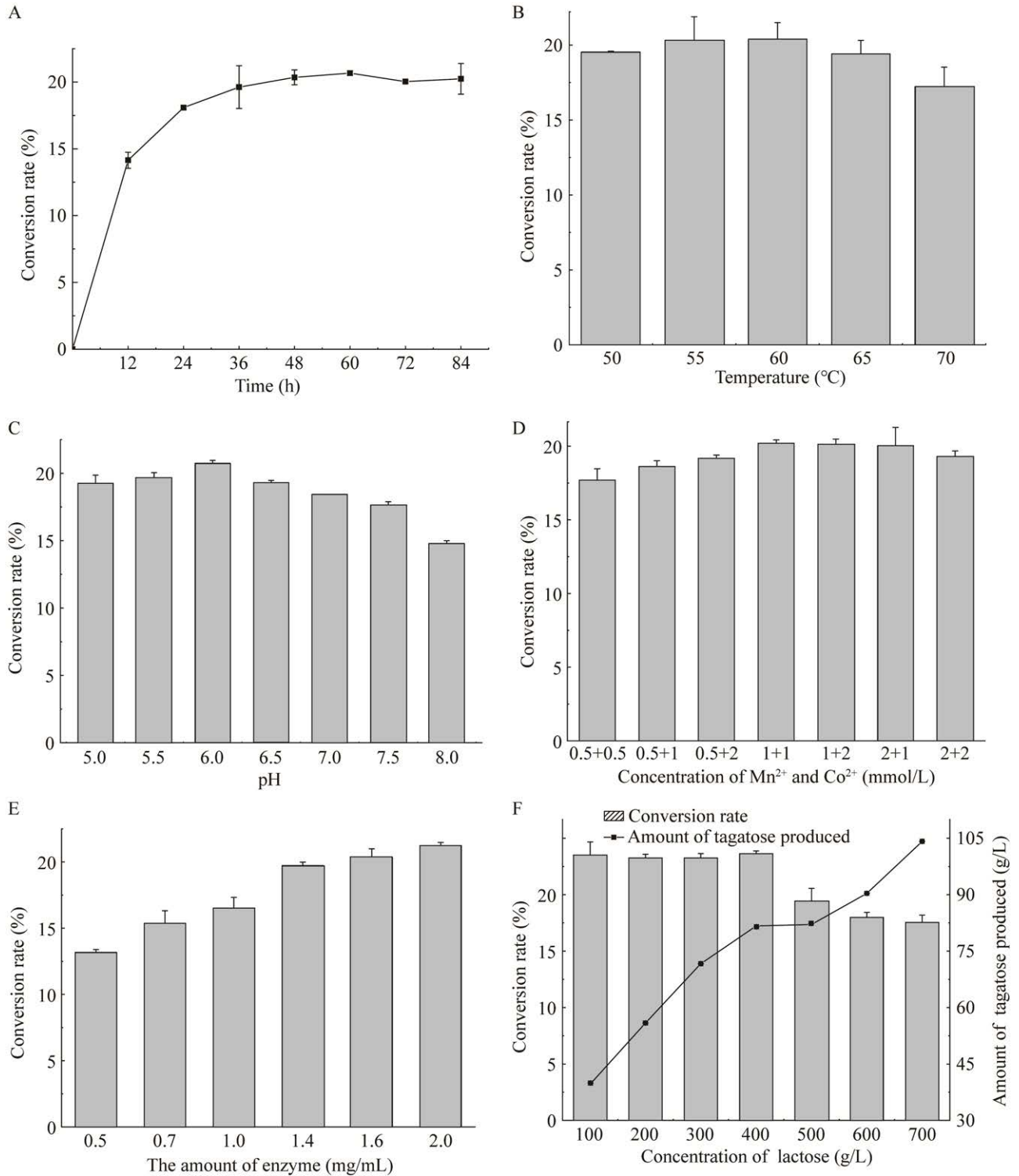


图 3 双酶制备塔格糖各条件的确定

Figure 3 Determination of the conditions for double-enzyme preparation of tagatose. Effects of time (A), temperature (B), Metal ion concentration (C), pH (D), Enzyme (E), and lactose concentration (F) on the production of D-tagatose by recombinant LfAI and β -galactosidase.

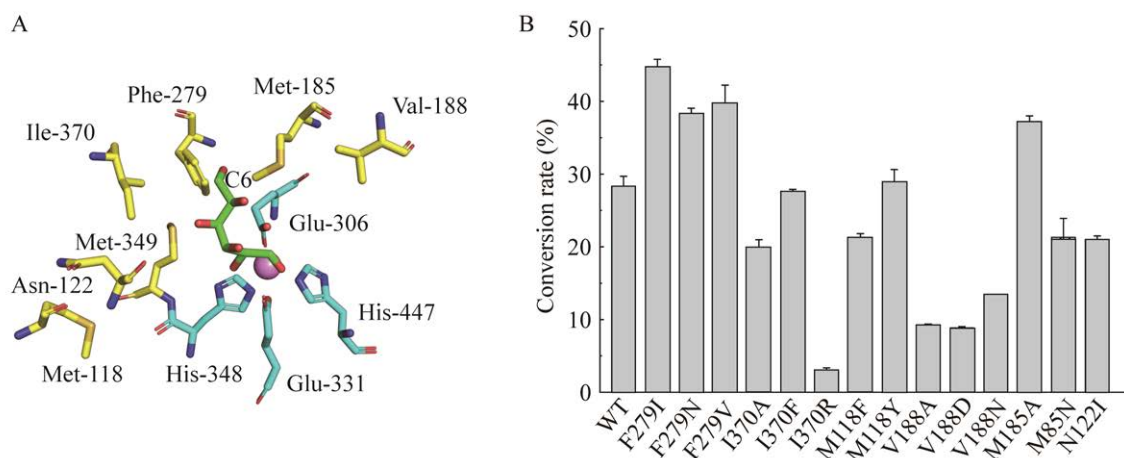


图 4 LfAI 底物结合分析(A)及突变体酶转化结果(B)

Figure 4 LfAI substrate binding analysis (A) and mutant enzyme conversion results (B).

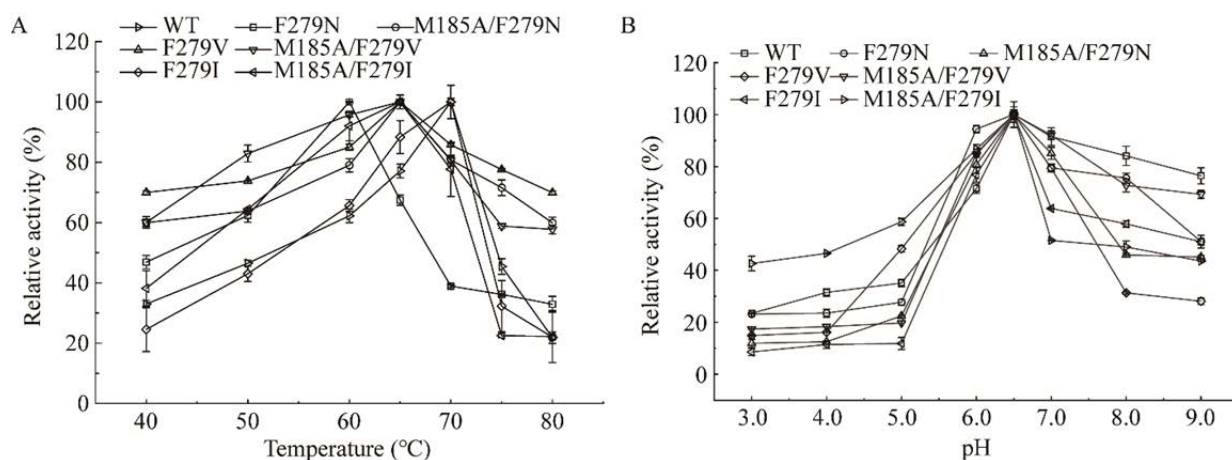


图 5 温度和 pH 对突变酶的影响

Figure 5 Effects of temperature (A) and pH (B) on mutant enzymes.

为亲本进行叠加构建 M185A/F279I、M185A/F279N、M185A/F279V, 并对纯化的野生型和突变型酶进行动力学研究。发现双突变体 M185A/F279I 酶对 D-半乳糖的活性最高, K_m 和 k_{cat} 分别为 530.8 mmol/L、19.9 s⁻¹ (表 2), 相比野生型酶, 对半乳糖的亲合力和催化效率均显著提高, 催化效率(k_{cat}/K_m) 提高至野生型的 8.2 倍。

2.5 M185A/F279I 突变体酶转化

在野生型双酶反应的最优反应体系下进行

表 2 野生型 LfAI 及部分突变体的比活和酶促反应动力学参数

Table 2 Specific activity and enzymatic reaction kinetics parameters of wild-type LfAI and some mutants

Enzyme	Specific activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
WT	1.9	2 972.1	13.6	4.59×10 ⁻³
F279I	3.0	2 266.9	20.7	9.14×10 ⁻³
M185A/F279I	11.2	530.8	19.9	3.76×10 ⁻²
F279V	3.5	3 786.0	30.7	8.11×10 ⁻³
M185A/F279V	3.3	2 502.2	24.1	9.63×10 ⁻³
F279N	3.5	3 692.7	57.8	1.57×10 ⁻²
M185A/F279N	6.8	4 856.3	39.0	8.02×10 ⁻³

酶转化实验来进一步验证突变体的应用性能。结果如图 5 所示, 在 0.1 mg/mL LfAI 加酶条件下, M185A/F279I 突变体塔格糖产物峰面积 (23.314 min) 明显提高(图 6A), 塔格糖产量达到 59.1 g/L, 是野生酶的 3.0 倍。提高加酶量可以明显提高野生酶和突变体酶的转化率(图 6B), 当加酶量为 1.4 mg/mL 时, M185A/F279I 突变体转化率可达 22.8%。

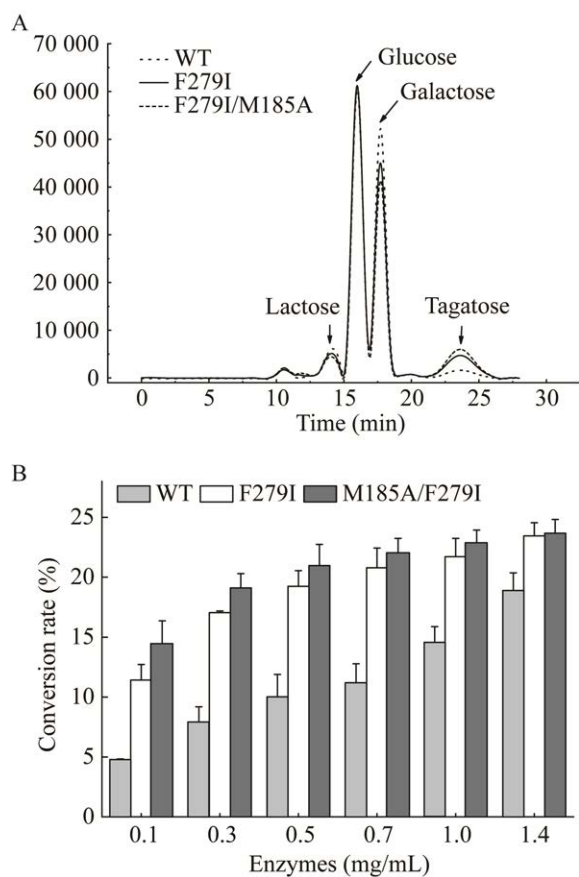


图 6 重组蛋白 LfAI 野生型与突变体酶转化产物分析

Figure 6 Analysis of recombinant protein LfAI wild type and mutant enzyme conversion products. A: The retention times of lactose, glucose, galactose and tagatose were 13.880 min, 15.962 min, 17.769 min and 23.412 min, respectively. B: The conversion rate of tagatose under different dosage of enzyme.

3 讨论

D-半乳糖是 L-AI 的非天然底物, 在酶催化反应过程中, 由于底物亲和力差, 半乳糖的异构化活性低, 导致塔格糖转化率低和加酶成本高。本研究将发酵乳杆菌来源的 LfAI 在枯草芽孢杆菌中进行异源表达。通过确定影响乳糖合成塔格糖的多因素反应条件, 野生型双酶反应的最优反应条件为: 在 55 °C、pH 6.0、底物乳糖 400 g/L、加酶量为 1.4 mg/mL 条件下, 反应 60 h, 塔格糖的转化率最高达到 19.91%。虽然塔格糖的转化率随加酶量(LfAI)的增加而提高, 但高加酶量使得成本增加, 不利于工业生产。同时, 高底物浓度更有利于工业生产过程放大, 但随着底物乳糖浓度的增加, 转化率也会降低; 而且高浓度乳糖还会促进转苷作用, 抑制水解作用^[23], 因此本实验选择以 400 g/L 乳糖为底物。

为了提高 LfAI 对 D-半乳糖的转化率, 本研究围绕底物结合口袋中与 D-半乳糖 C6 可能存在空间位阻的氨基酸残基进行了理性设计。实验发现 279 位点突变可有效提高对 D-半乳糖的转化率(图 4B), 在 1.4 mg/mL 加酶量下, 突变酶 F279I 的转化率达 45.2%, 对 D-半乳糖亲和力的增强最为明显。前人的研究同样发现了该位点苯丙氨酸(F)被天冬氨酸(N)或异亮氨酸(I)取代时, 半乳糖异构活性增强^[24]。凝结芽孢杆菌 *Bacillus coagulans* NL01 (BCAI)^[24]与希瓦氏菌属 *Shewanella* sp. ANA-3 (ShLAI)^[25]来源 L-AI 研究发现, BCAI F279I 突变体在催化 250 g/L D-半乳糖生成塔格糖转化率达到 35.5%; 而 ShLAI 突变 F279N 对半乳糖偏好性高于 L-阿拉伯糖, 转化率最大达到 36%。

本研究发现, D-半乳糖异构化活性可通过 2 种方式实现: (1) 减小空间位阻以增加 D-半乳糖的亲合性^[26], 如 F279I、F279V、M185A 可

通过将 D-半乳糖 C6 的空间位阻最小化提高转化率(图 7); (2) 引入氢键提高底物亲和力, 如 F279N, 但其对异构活性的影响弱于 F279I 突变体。因此, 本研究最终将获得的双突变体 M185A/F279I 应用于塔格糖的酶法制备中, 发现相比野生型酶, 塔格糖的转化率有明显的提高。在 400 g/L 乳糖载量下, 最终突变菌株粗酶催化底物乳糖合成产物塔格糖的最高转化率 22.8%。

从乳糖到塔格糖的整个过程需要经水解和可逆异构化两步反应, 其最大理论得率为 50%, 但由于水解反应不彻底、异构化效率过低以及热力学平衡问题, 实际难以达到。本研究通过分子改造提升了 LfAI 对 D-半乳糖的亲和力, 有效提高了异构化反应的效率和转化率, 为塔格

糖的高效规模化生产提供了优良的酶制剂, 但相较理论转化率仍有一定提升空间。除此以外, 还有部分研究报道了降低反应 pH 以改变转化率平衡, 以及增强酶耐热性或固定化提升酶的稳定性和重复利用率等提升 L-AI 应用性能的策略。如 Rhimi 等^[27]对嗜热脂肪芽孢杆菌 (*B. stearothermophilus*) US100 来源的 L-AI (BSAI)进行分子改造, 获得的 Q268K 更具耐酸性, 王静等^[28]以海藻酸钠为载体、戊二醛为交联剂, 对 L-AI 进行固定化, 使得酶具有较好的操作稳定性, 重复操作 7 次后相对酶活仍在 55%以上。增强酶的热稳定性以及反应工艺条件的进一步优化等。这些相关研究为我们后续进一步改造 LfAI 提供了很好的理论和技术参考。

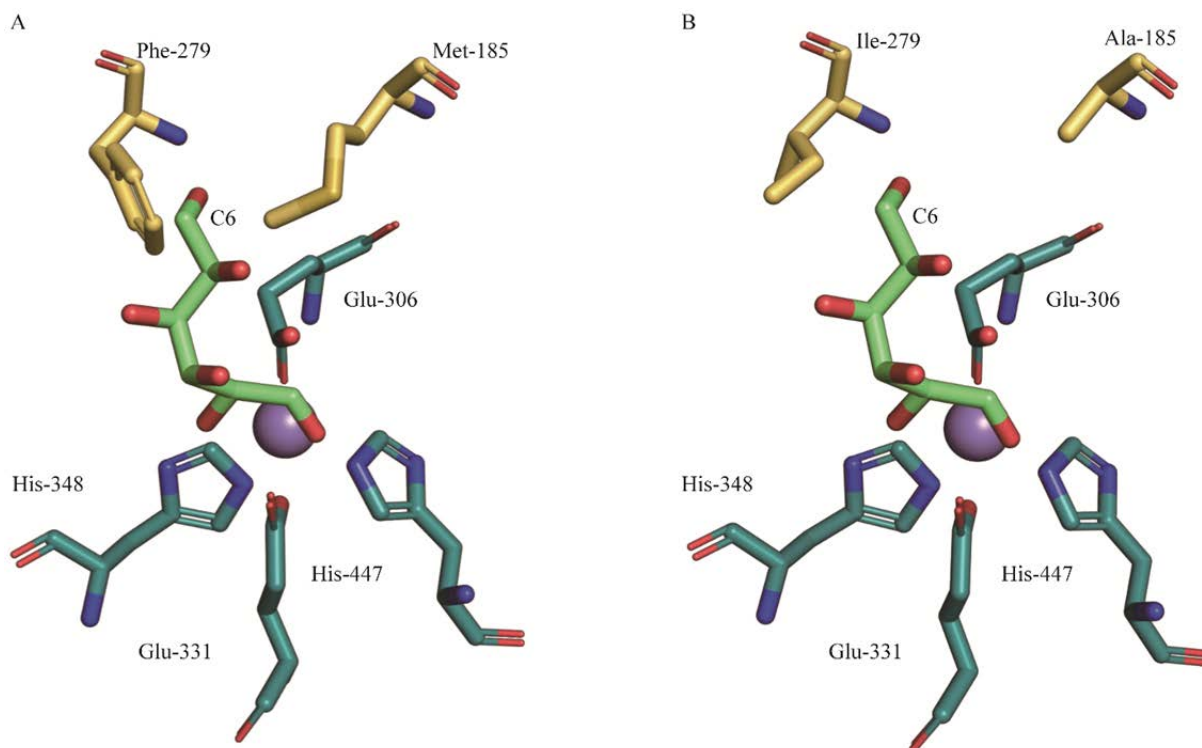


图 7 D-半乳糖与 WT (A)和 M185A/F279I (B)的对接

Figure 7 Docking of D-galactose to WT (A) and M185A/F279I (B). D-galactose molecules and amino acid residues are displayed in stick form and colored according to elemental types. Carbon atoms of D-galactose were colored green for a better visualization.

REFERENCES

- [1] Food and Drug Administration HHS. Food labeling: health claims; D-tagatose and dental caries. Final rule[J]. Federal Register, 2003, 68(128): 39831-39833.
- [2] KRUGER CL, WHITTAKER MH, FRANKOS VH, TRIMMER GW. 90-day oral toxicity study of D-tagatose in rats[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 1999, 29(2 Pt 2): S1-S10.
- [3] CHIU CJ, LIU SM, WILLETT WC, WOLEVER TM, BRAND-MILLER JC, BARCLAY AW, TAYLOR A. Informing food choices and health outcomes by use of the dietary glycemic index[J]. Nutrition Reviews, 2011, 69(4): 231-242.
- [4] LEVIN G. Use of tagatose to enhance key blood factors[P]: US 60028750. 2007-02-08.
- [5] VALERI F, BOESS F, WOLF A, GOLDLIN C, BOELSTERLI UA. Fructose and tagatose protect against oxidative cell injury by iron chelation[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 22(1/2): 257-268.
- [6] DONNER TW, MAGDER LS, ZARBALIAN K. Dietary supplementation with D-tagatose in subjects with type 2 diabetes leads to weight loss and raises high-density lipoprotein cholesterol[J]. Nutrition Research, 2010, 30(12): 801-806.
- [7] BUEMANN B, TOUBRO S, RABEN A, BLUNDELL J, ASTRUP A. The acute effect of D-tagatose on food intake in human subjects[J]. The British Journal of Nutrition, 2000, 84(2): 227-231.
- [8] PIL K. 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] BEADLE JR, SAUNDERS JL, WAJDA TJ. Process for manufacturing tagatose[P]: KR100190671. 1999-06-01.
- [10] KIM HJ, OH DK. 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] GUO Q, AN YF, YUN JH, YANG MM, MAGOCHA TA, ZHU JF, XUE YB, QI YL, HOSSAIN Z, SUN WJ, QI XH. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 940-946.
- [12] CHEETHAM PSJ, WOOTTON AN. Bioconversion of D-galactose into D-tagatose[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1993, 15(2): 105-108.
- [13] RHIMI M, BEJAR S. Cloning, purification and biochemical characterization of metallic-ions independent and thermoactive L-arabinose isomerase from the *Bacillus stearothermophilus* US100 strain[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1760(2): 191-199.
- [14] YUAN J, RAVIKUMAR Y, ZHANG GY, YUN JH, ZHANG YF, ZABED HM, QI XH. L-arabinose isomerase from *Lactobacillus parabuchneri* and its whole cell biocatalytic application in D-tagatose biosynthesis from D-galactose[J]. Food Bioscience, 2021, 41: 101034.
- [15] ZHANG SS, XU ZS, MA M, ZHAO GY, CHANG RL, SI HL, DAI MX. A novel *Lactococcus lactis* L-arabinose isomerase for D-tagatose production from lactose[J]. Food Bioscience, 2022, 48(48): 101765.
- [16] CHOUAYEKH H, BEJAR W, RHIMI M, JELLELI K, MSEDDEI M, BEJAR S. Characterization of an L-arabinose isomerase from the *Lactobacillus plantarum* NC8 strain showing pronounced stability at acidic pH[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 277(2): 260-267.
- [17] YAN M, ZHU YM, ZHANG LL, KANG ZK, LZUMORI K, SUN YX, MA YH. Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5[J]. Microbiological research, 2014, 169(2/3): 171-178.
- [18] 盛露菲, 杨卫康, 吴敬, 陈晟. 发酵乳杆菌来源 4,6- α -葡萄糖基转移酶的酶学表征及产物性质鉴定[J]. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4363-4372.
- SHENG LF, YANG WK, WU J, CHEN S. Characterization and identification of *Lactobacillus fermentum* 4,6- α -glucosyltransferase and its products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(12): 4363-4372 (in Chinese).
- [19] XU Z, QING YJ, LI S, FENG XH, XU H, OUYANG PK. A novel L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum* CGMCC2921 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterization[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 70(1-2): 1-7.
- [20] LEE SJ, LEE DW, CHOE EA, HONG YH, KIM SB, KIM BC, PYUN YR. Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH

- optimum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7888-7896.
- [21] FAN C, XU W, ZHANG T, ZHOU L, JIANG B, MU WM. Engineering of *Alicyclobacillus hesperidum* L-arabinose isomerase for improved catalytic activity and reduced pH optimum using random and site-directed mutagenesis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(7): 1480-1492.
- [22] OH DK, OH HJ, KIM HJ, CHEON J, KIM P. Modification of optimal pH in L-arabinose isomerase from *Geobacillus stearothermophilus* for D-galactose isomerization[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2006, 43(1/4): 108-112.
- [23] ZHAO L, ZHOU YZ, QIN S, QIN PP, CHU JL, HE BF. β -galactosidase BMG without galactose and glucose inhibition: secretory expression in *Bacillus subtilis* and for synthesis of oligosaccharide[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120: 274-278.
- [24] ZHENG ZJ, MEI WD, XIA MJ, HE Q, OUYANG J. Rational design of *Bacillus coagulans* NL01 L-arabinose isomerase and use of its F279I variant in D-tagatose production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(23): 4715-4721.
- [25] JAYARAMAN AB, KANDASAMY T, VENKATARAMAN D, S M. Rational design of *Shewanella* sp. L-arabinose isomerase for D-galactose isomerase activity under mesophilic conditions[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 147: 109796.
- [26] CHOI JM, LEE YJ, CAO TP, SHIN SM, PARK MK, LEE HS, di LUCCIO E, KIM SB, LEE SJ, LEE SJ, LEE SH, LEE DW. Structure of the thermophilic L-arabinose isomerase from *Geobacillus kaustophilus* reveals metal-mediated intersubunit interactions for activity and thermostability[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 596: 51-62.
- [27] RHIMI M, AGHAJARI N, JUY M, CHOUAYEKH H, MAGUIN E, HASER R, BEJAR S. Rational design of *Bacillus stearothermophilus* US100 L-arabinose isomerase: potential applications for D-tagatose production[J]. Biochimie, 2009, 91(5): 650-653.
- [28] 王静, 揣玉多, 汤卫华, 侯婷. 海藻酸钠包埋法固定 L-阿拉伯糖异构酶的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16): 92-95.
- WANG J, CHUAI YD, TANG WH, HOU T. Research on the immobilization of L-arabinose isomerase by embedded in sodium alginate[J]. Food Research and Development, 2017, 38(16): 92-95 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)