

• 生物育种与工艺优化 •

重组枯草芽孢杆菌全细胞高效催化合成 D-甘露糖

刘祖怡¹, 乔邳钠², 杜宇轩², 石选平², 尤甲甲², 饶志明^{2*}, 王立^{1*}

1 江南大学 食品学院, 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

刘祖怡, 乔邳钠, 杜宇轩, 石选平, 尤甲甲, 饶志明, 王立. 重组枯草芽孢杆菌全细胞高效催化合成 D-甘露糖[J]. 生物工程学报, 2024, 40(9): 3158-3170.

LIU Zuyi, QIAO Zhina, DU Yuxuan, SHI Xuanping, YOU Jiajia, RAO Zhiming, WANG Li. Efficient whole-cell biosynthesis of D-mannose by recombinant *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(9): 3158-3170.

摘要: D-甘露糖是一种在食品、医疗、化妆品等领域具有很大经济价值和应用价值的天然己糖。但是目前大部分生物合成法都是以大肠杆菌作为宿主, 生产过程中存在安全性问题, 对后续应用产生了诸多限制。本研究通过比较多个来源的甘露糖异构酶的酶学性质, 筛选出最优来源甘露糖异构酶。以食品安全级菌株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 为底盘细胞, 将最优来源的甘露糖异构酶进行异源表达, 获得了重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA*, 用于以 D-果糖为底物全细胞催化高效合成 D-甘露糖。通过优化转化温度、pH、底物浓度等条件, 提高其转化合成 D-甘露糖的效率。结果表明, 重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 在最适转化条件下进行 5 L 发酵罐全细胞转化, 分别以 500 g/L 果糖和 600 g/L 果糖为底物, 转化 6 h 后 D-甘露糖的产量分别为 138.74 g/L 和 163.30 g/L, 转化率分别达到 27.75% 和 27.22%, 这是目前报道的以食品级菌株进行 D-甘露糖生产的最高产量。本研究为 D-甘露糖的工业化安全生产及应用奠定了重要基础。

关键词: D-甘露糖; 枯草芽孢杆菌; 甘露糖异构酶; 全细胞催化

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100900); 国家自然科学基金(32070035, 32071470)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100900) and the National Natural Science Foundation of China (32070035, 32071470).

*Corresponding authors. E-mail: RAO Zhiming, raozhm@jiangnan.edu.cn; WANG Li, wangli@jiangnan.edu.cn

Received: 2023-12-21; Accepted: 2024-03-04; Published online: 2024-08-27

Efficient whole-cell biosynthesis of D-mannose by recombinant *Bacillus subtilis*

LIU Zuyi¹, QIAO Zhina², DU Yuxuan², SHI Xuanping², YOU Jiajia², RAO Zhiming^{2*}, WANG Li^{1*}

1 School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: D-mannose is a natural hexose with great economic and application values in the food, medicine, and cosmetic fields. However, most biosynthesis methods of D-mannose rely on *Escherichia coli* as the host, which poses safety issues during the production process and imposes limitations on subsequent applications. This study compared the enzyme properties of mannose isomerases from multiple sources to select the most suitable source. *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMIaseA* was constructed with “generally recognized as safe” (GRAS) *Bacillus subtilis* as the host and used as a whole-cell catalyst to synthesize D-mannose from D-fructose. Optimizing the conversion conditions such as culture temperature, pH, and substrate concentration increased the yield of D-mannose. The results showed that the conversion rates reached 27.75% and 27.22% and the yields of D-mannose were 138.74 g/L and 163.30 g/L after 6 h whole-cell transformation with D-fructose at the concentrations of 500 g/L and 600 g/L, respectively, in a 5 L fermentor. This study achieves the highest yield of D-mannose produced under the catalysis by recombinant *B. subtilis* that has ever been reported and provides a basis for the industrial production and application of D-mannose.

Keywords: D-mannose; *Bacillus subtilis*; mannose isomerase; whole-cell catalysis

近年来,由于人们饮食结构不均衡,摄入过多的高脂肪、高糖的食物,肥胖和糖尿病的全球发病率不断增加。因此,对低卡健康饮食的研究非常必要。D-甘露糖作为一种天然己糖,其甜度仅有蔗糖的60%,是低热量功能糖。D-甘露糖具有多种功能,如减轻炎症性肠病^[1]、治疗类风湿性关节炎^[2]、预防哮喘性气道炎症^[3]、治疗癌症^[4-5]、治疗先天性糖基化障碍^[6]等。D-甘露糖在食品、化妆品和制药行业具有广泛的应用前景。此外,它可以用于合成抗肿瘤药物^[7-8]、免疫刺激剂、辅助保湿剂,在食品、医学等领域都具有很大的经济价值和应用价值^[8]。

目前,主要通过提取法^[9-10]、化学法^[11]和生物法^[12]来制备D-甘露糖。物理提取法主要是通过植物降解提取^[13],用乙醇对咖啡渣进行高温预处理,通过酶水解产生糖。化学合成法以葡萄糖为原料,通常使用钼酸盐等化学试剂在强酸、高温条件下催化葡萄糖差向异构生成甘露糖^[14]。但提取法反应步骤多、成分复杂、需要高温,化学法则反应条件苛刻、会产生副产物,对人体和环境产生不利的影响^[15],因此寻求更高效环保的合成方法迫在眉睫。生物法因具有高效、反应条件温和、成本低且绿色环保等优点已成为目前D-甘露糖生产的主要方法,常用的酶有D-来苏

糖异构酶^[12]、D-甘露糖异构酶^[16-17]、纤维二糖 2-差向异构酶^[18]和 D-甘露糖 2-差向异构酶^[19]。其中, D-来苏糖异构酶和纤维二糖 2-差向异构酶因底物特异性受限, D-甘露糖 2-差向异构酶因其催化效率较低, 均不适合用于 D-甘露糖合成, 因此经过多方面考量选择 D-甘露糖异构酶(D-mannose isomerases, MIaseA)为本实验的研究对象进行 D-甘露糖的合成。

虽然目前果糖生物合成甘露糖已取得一定成效。Hua 等^[20]利用丁香假胞菌来源的甘露糖异构酶合成甘露糖的转化率为 27%; Hirose 等^[21]利用放射性农杆菌来源的甘露糖异构酶合成甘露糖的转化率为 23%; Kasumi 等^[22]利用嗜热裂孢菌来源的甘露糖异构酶合成甘露糖的转化率为 25%; Park 等^[18]利用斯氏普罗威登斯菌来源的甘露糖异构酶合成甘露糖的转化率为 25%。但是目前对生产甘露糖的研究主要是以大肠杆菌作为底盘细胞实现果糖到甘露糖的转化。大肠杆菌不是食品安全级菌株^[23-24], 生产的化学品存在内毒素污染的潜在风险, 不符合食品卫生要求, 不利于后续生产应用。而枯草芽孢杆菌因具有无毒无害、高效抑菌、不易残留、不易产生耐药性的特点而更具开发潜力。本研究尝试在食品安全级菌株枯草芽孢杆菌中构建细胞工厂, 实现安全高效合成甘露糖。Hu 等^[25]利用枯草芽孢杆菌作为底盘细胞制成浓缩的酶溶液冻干进行甘露糖的合成, 转化率达到 25%, 但酶液转化难以回收。本研究采用的全细胞转化法在工业生产过程中可以省去繁琐的酶提取步骤、制备更简单, 可以重复批次转化, 生产成本更低。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

所用菌株大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

BL21(DE3)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 以及质粒 pMA5 均为本实验室保藏, 重组质粒 pET28a-*SsMIaseA*、pET28a-*ThMIaseA*、pET28a-*PsMIaseA*、pET28a-*EcMIaseA*、pET28a-*PgMIaseA* 和 pET28a-*PstMIaseA* 为生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.2 酶和试剂

*Bam*H I和 *Nde* I购自 TaKaRa 公司; 质粒提取、胶回收、同源重组试剂盒以及 PCR 酶等购自南京诺维赞生物科技有限公司; 果糖、甘露糖等购自上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母浸粉 5.0, NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0。固体培养基含 1.5%–2.0%左右的琼脂粉。

种子培养基(g/L): 蔗糖 15.0, 酵母浸粉 20.0, 氯化钠 8.0, 无水磷酸氢二钠 1.0, 50%氨水调 pH 至 7.0。

发酵培养基(g/L): 蔗糖 15.0, 酵母浸粉 20.0, 氯化钠 8.0, 无水磷酸氢二钠 1.0, 50%氨水调 pH 至 7.0。

补料培养基(g/L): 蔗糖 300.0, 酵母浸粉 70.0。

1.2 方法

1.2.1 不同来源 D-甘露糖异构酶重组大肠杆菌的构建

在 NCBI 数据库中选取了 6 个不同来源[链霉菌 (*Streptomyces* sp.)、嗜热菌 (*Thermobifida halotolerans*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas geniculata*) 和斯氏普罗威登斯菌 (*Providencia stuartii*)]的经密码子优化的甘露糖异构酶编码基因序列提交公司进行人工合成, 连接 pET28a 质粒(酶切位点 *Eco*R I 和 *Hind* III), 之后分别将公司提供的重组质粒 pET28a-*SsMIaseA*、pET28a-*ThMIaseA*、pET28a-*PsMIaseA*、

pET28a-*EcMIaseA*、pET28a-*PgMIaseA* 和 pET28a-*PstMIaseA* 转化至 *E. coli* BL21(DE3)感受态, 验证转化子。重组菌株分别命名为: *E. coli* BL21/pET28a-*SsMIaseA*、*E. coli* BL21/pET28a-*ThMIaseA*、*E. coli* BL21/pET28a-*PsMIaseA*、*E. coli* BL21/pET28a-*EcMIaseA*、*E. coli* BL21/pET28a-*PgMIaseA* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*PstMIaseA*。

1.2.2 不同来源 D-甘露糖异构酶在大肠杆菌中的表达及纯化

将 6 个不同来源的重组大肠杆菌划线活化后, 挑取单菌落接种 10 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 8–12 h。然后, 按 1%接种量转接 50 mL LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养约 1.5–2 h (OD_{600} 约为 0.6–0.8)后添加乳糖至终浓度为 1 g/L, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 诱导培养 12–14 h, 以诱导甘露糖异构酶的表达。

诱导结束后, 将菌液离心倒掉上清液, Tris-HCl 缓冲液(200 mmol/L, pH 9.0)清洗菌体 2 遍, 重悬菌液后利用超声波破碎仪进行超声破碎, 离心后获得的上清液即为粗酶液, 粗酶液一部分用于 SDS-PAGE 分析甘露糖异构酶表达情况, 剩余则利用亲和层析镍柱进行纯化以进行酶学性质分析, 具体操作参考文献[26]。

1.2.3 不同来源 D-甘露糖异构酶的酶学性质研究

温度对不同来源的 D-甘露糖异构酶活性的影响测定: 将 200 $\mu\text{g/mL}$ 的纯酶反应体系分别在 pH 9.0、30–60 $^{\circ}\text{C}$ 、底物浓度 200 mmol/L 的条件下反应 10 min 后煮沸 5 min 灭活, HPLC 检测 D-甘露糖含量, 设置酶活最高组为 100% 对照。

pH 对不同来源的 D-甘露糖异构酶活性的影响测定: 将 200 $\mu\text{g/mL}$ 的纯酶反应体系分别在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0–10.0、底物浓度 200 mmol/L 的条

件下反应 10 min 后煮沸 5 min 灭活, HPLC 检测 D-甘露糖含量, 设置酶活最高组为 100% 对照。缓冲体系如下: 200 mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0–8.0)、200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.0)和 200 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.0)。

大肠杆菌来源的甘露糖异构酶(*EcMIaseA*)热稳定性: pH 9.0 的条件下, 将纯酶置于 30–70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中分别保温 0、0.5、1.5、2 h, 再加入底物转化液反应 6 h, 控制反应体系纯酶浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 、底物浓度 200 mmol/L, 设定未处理酶液酶活为 100%。

EcMIaseA pH 稳定性: 分别调节纯酶反应体系 pH 为 4.0–11.0, 35 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下存储 30 min, 再加入底物转化液反应 6 h, 控制反应体系纯酶浓度 200 $\mu\text{g/mL}$ 、底物浓度 200 mmol/L, 测定酶活, 设置未处理酶液酶活为 100%。缓冲体系分别为: 200 mmol/L 醋酸钠缓冲液(pH 4.0–6.0)、200 mmol/L PBS 缓冲液(pH 6.0–8.0)、200 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.0)和 200 mmol/L 甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–11.0)。

1.2.4 最优来源 D-甘露糖异构酶在枯草芽孢杆菌中的表达

分别以重组质粒 pET28a-*EcMIaseA* 和 pMA5-*EcMIaseA*-F (5'-aaagtgaatcagggggatccatgaaatgggtaaacaccctaa-3')、pMA5-*EcMIaseA*-R (5'-gaatttcgacctctagaacgcgtttatttcgcattaatatccagcag-3')作为模板和上下游引物进行 PCR 扩增获得 *EcMIaseA* 基因片段, 与 pMA5 线性化质粒(*Bam*H I 和 *Nde* I 双切)同源重组连接后化转 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂布 LB 抗性平板(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 12 h 左右, 菌落 PCR 验证正确的菌株命名为 *E. coli* BL21/pMA5-*EcMIaseA*。

提取重组质粒 pMA5-*EcMIaseA* 转化 *B. subtilis* 168 感受态细胞, 同样涂布 LB 抗性平板(含 50 $\mu\text{g/mL}$

卡那霉素), 37 °C 培养箱培养 12 h 左右, 菌落 PCR 验证正确菌株命名为 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA*。

1.2.5 重组枯草芽孢杆菌全细胞转化条件优化

重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 划线活化后接种 10 mL LB 培养基(含 50 µg/mL 卡那霉素), 37 °C、180 r/min 摇床培养 11–12 h 后, 以 1%接种量转接 100 mL LB 培养基(含 50 µg/mL 卡那霉素), 25 °C、180 r/min 摇床培养 12 h 左右诱导甘露糖异构酶表达。诱导结束后离心收集菌体, 用于全细胞转化条件优化。

转化温度对全细胞催化合成 D-甘露糖的影响: 将收集的菌体在底物浓度 600 g/L、pH 9.0、 $OD_{600}=70$ 条件下全细胞转化, 转化温度分别为 30、35、40、45、50、55、60 °C, 反应 6 h 取样, 煮沸 5 min, 离心取上清, 利用 HPLC 测果糖、甘露糖浓度。

转化 pH 对全细胞催化合成 D-甘露糖的影响: 将收集的菌体在底物浓度 600 g/L、转化温度 50 °C、 $OD_{600}=70$ 条件下全细胞转化, pH 分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 反应 6 h 取样, 离心取上清, 利用 HPLC 测果糖、甘露糖浓度。

转化 OD_{600} 对全细胞催化合成 D-甘露糖的影响: 将收集的菌体在底物浓度 600 g/L、转化温度 50 °C、pH 9.0 条件下全细胞转化, OD_{600} 分别为 20、30、40、50、60、70、80, 反应 6 h 取样, 离心取上清, 利用 HPLC 测果糖、甘露糖浓度。

底物 D-果糖浓度对全细胞催化合成 D-甘露糖的影响: 将收集的菌体在转化温度 50 °C、pH 9.0、 $OD_{600}=70$ 条件下进行全细胞转化, 底物浓度分别为 300、400、500、600、700 g/L, 反应 6 h 取样, 离心取上清, 利用 HPLC 测果糖、甘露糖浓度。

金属离子对全细胞催化合成 D-甘露糖的影

响: 在转化体系中添加不同金属离子 Co^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Cu^{2+} , 控制其他转化条件相同条件下, 转化 6 h, 利用 HPLC 检测果糖、甘露糖浓度, 以不添加金属离子相对活性为 100%。

1.2.6 细胞重复批次对全细胞催化合成 D-甘露糖的影响

全细胞催化合成 D-甘露糖时, 将重组菌重悬于 200 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中, 加入 D-果糖 500 g/L, 控制初始菌体量 $OD_{600}=70$, 转化温度为 50 °C、pH 9.0, 每批次反应初始及结束均取样, 利用 HPLC 检测分析 D-果糖及 D-甘露糖含量, 重复上述操作进行重复批次全细胞转化。

1.2.7 5 L 发酵罐全细胞转化合成 D-甘露糖

按照上述全细胞转化的最优条件, 将重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 在 5 L 发酵罐中进行 D-甘露糖的放大生产。挑取单菌落接种 10 mL LB 培养基(卡那霉素终浓度 50 µg/mL), 37 °C、200 r/min 摇床培养 12 h 左右。按 5%的接种量转接 100 mL 种子培养基(卡那霉素终浓度 50 µg/mL), 于 37 °C、200 r/min 摇床培养 14 h 左右, 即得到种子液。条件控制如下: 初始温度为 37 °C、初始 pH 7.0、初始搅拌转速 300 r/min、初始通气量 3 L/min (1.5 vvm), 之后通过溶氧偶联转速的方式将发酵过程的溶氧控制在 30%左右, 同时补料溶液偶联酸泵将 pH 控制在 7.0。反应过程中及反应结束后取样, 利用 HPLC 测果糖、甘露糖含量。

1.2.8 底物和产物的检测

使用安捷伦 1260 高效液相色谱示差折光检测器(refractive index detector, RID)分析, 分析条件为: Hi-Plex Ca 型色谱柱(300 mm×7.7 mm), 柱温 80 °C, 检测池温度 40 °C, 流速 0.4 mL/min, 流动相为超纯水, 单个样品运行时长 40 min。

2 结果与分析

2.1 不同来源 MIaseA 的克隆与表达

以大肠杆菌为底盘细胞果糖生物合成甘露糖已取得一定成效, 数据整理见表 1。从 NCBI 数据库中检索到 6 个不同来源的 D-甘露糖异构酶的序列, 利用 Jalview 软件进行序列比对分析, 结果显示, 大肠杆菌来源的甘露糖异构酶与嗜热菌、链霉菌、丁香假单胞菌、弯曲假单胞菌和斯氏普罗威登斯菌来源的甘露糖异构酶氨基酸序列相似性分别为 41.25%、39.82%、43.36%、25.81%和 6.54%。由图 1 可知, 在进化过程中保守位点分布分散, 但保守性相对较好, 这些位点

据推测可能是与酶的结构或功能密切相关的氨基酸位点。

链霉菌 (*Streptomyces* sp.)、嗜热菌 (*Thermobifida halotolerans*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、弯曲假单胞菌 (*Pseudomonas geniculata*) 来源的甘露糖异构酶编码基因大小均在 1 240 bp 左右, 斯氏普罗威登斯菌 (*Providencia stuartii*) 来源的甘露糖异构酶编码基因大小在 552 bp 左右。SDS-PAGE 分析结果显示 6 种不同来源的 D-甘露糖异构酶均成功实现表达^[21](图 2), 且重组蛋白经 Ni-NTA 亲和柱纯化后在相应大小位置有单一条带(图 3)。

表 1 大肠杆菌为底盘细胞生物合成甘露糖研究成果

Table 1 Research achievements in the biosynthesis of mannose by *Escherichia coli* as chassis cells

Enzyme source	Optimal temperature (°C)	Optimal pH	Conversion rate (%)	References
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	30	7.5	NR	[27]
<i>Xanthomonas rubrilineans</i>	35	7.8	NR	[28]
<i>Pseudomonas cepacia</i>	50	6.4	NR	[29]
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	60	7.5	23	[21]
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	75	7.5	25	[18]
<i>Thermobifida fusca</i> MBL10003	60	8.0	25	[22]
<i>Pseudomonas syringae</i>	45	7.5	27	[17]

NR: Not reported.

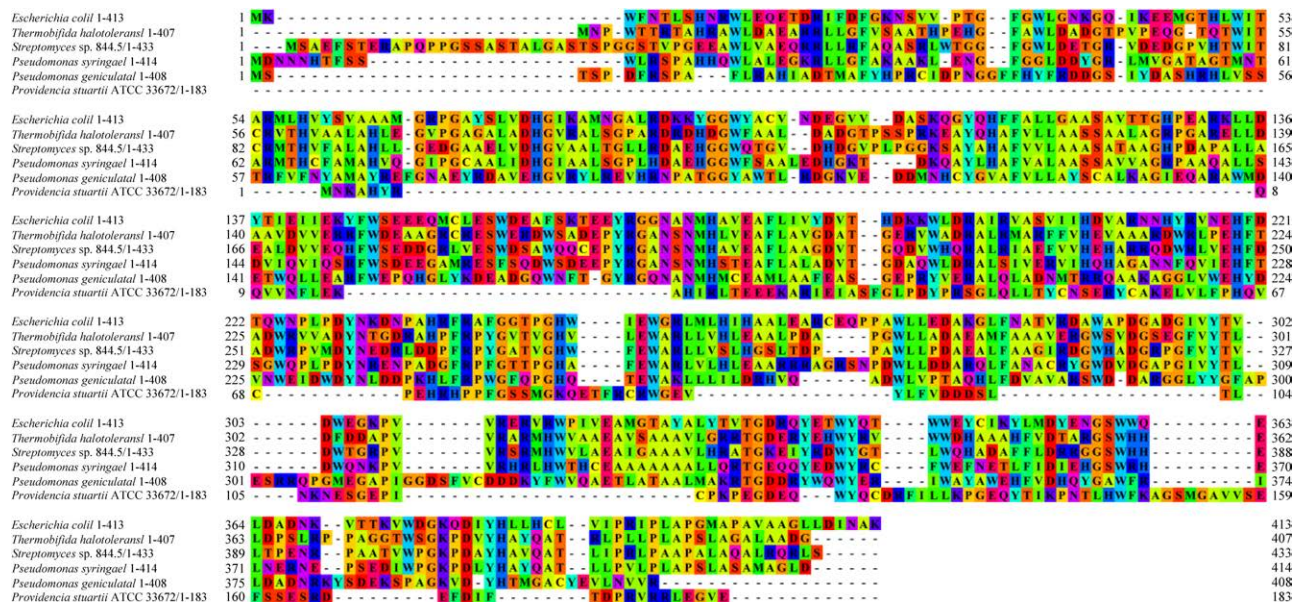


图 1 不同来源甘露糖异构酶的序列分析图

Figure 1 Sequence analysis of MIaseA from different sources.

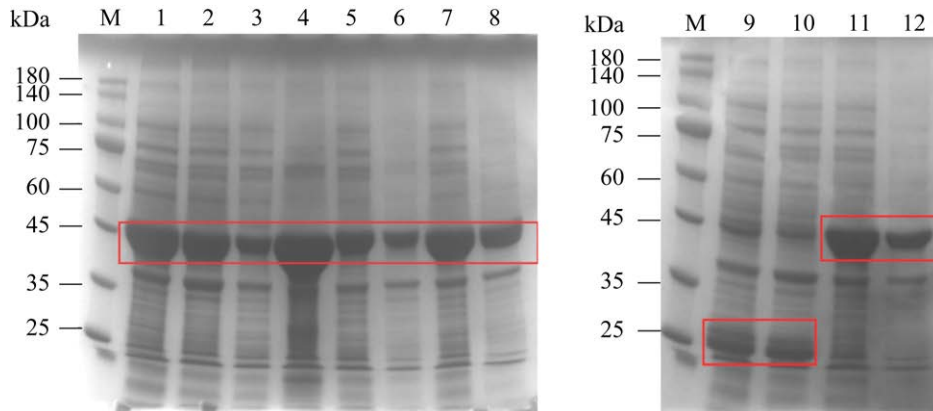


图2 不同来源甘露糖异构酶的粗酶液纯化图

Figure 2 Crude enzyme analysis of MIaseA from different sources. Lane M: Protein marker; Lane 1: EcMIaseA cell breaking supernatant; Lane 2: EcMIaseA cytoplasm precipitation; Lane 3: ThMIaseA cell breaking supernatant; Lane 4: ThMIaseA cytoplasm precipitation; Lane 5: PsMIaseA cell breaking supernatant; Lane 6: PsMIaseA cytoplasm precipitation; Lane 7: PgMIaseA cell breaking supernatant; Lane 8: PgMIaseA cytoplasm precipitation. Lane M: Protein marker; Lane 9: PstMIaseA cell breaking supernatant; Lane 10: PstMIaseA cytoplasm precipitation; Lane 11: SsMIaseA cell breaking supernatant; Lane 12: SsMIaseA cytoplasm precipitation.

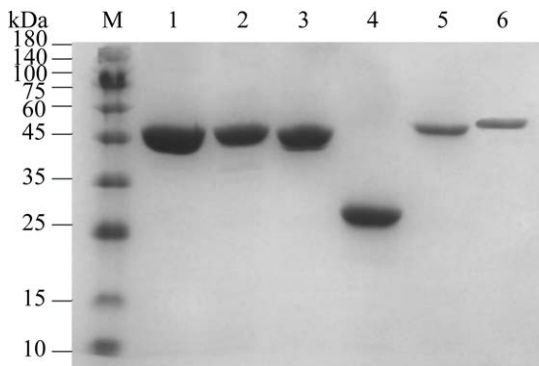


图3 不同来源甘露糖异构酶的纯酶液纯化

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the purified MIaseA from different sources. Lane M: Protein marker; Lane 1: EcMIaseA; Lane 2: ThMIaseA; Lane 3: PsMIaseA; Lane 4: PstMIaseA; Lane 5: PgMIaseA; Lane 6: SsMIaseA.

2.2 温度和 pH 对 MIaseA 酶活力和稳定性的影响

2.2.1 温度对 MIaseA 酶活力和稳定性的影响

由图 4 可知,随着温度的升高,6 种不同来源甘露糖脱氢酶的酶活均有所提高,分别在 40–50 °C 达到最高点后逐步降低。EcMIaseA 在 50 °C 时酶活达到最高水平,为 728 U/mg;

果糖消耗量约 54 mmol/L,甘露糖产量约为 48 mmol/L,转化率约为 24%,果糖消耗量大于转化率可能因为转化过程中产生了损耗。PstMIaseA 和 SsMIaseA 总体酶活较低,PstMIaseA 比酶活最高为 377 U/mg,SsMIaseA 比酶活最高为 161 U/mg,ThMIaseA 和 PgMIaseA 在 45 °C 条件下甘露糖产量分别约为 44 mmol/L 和 40 mmol/L,转化率约为 22%和 20%,比酶活分别是 665 U/mg 和 606 U/mg,PsMIaseA 在 50 °C 条件下甘露糖产量约为 35 mmol/L,转化率约为 17.5%,酶活力达到最高,比酶活为 535 U/mg,酶活表现均不如 EcMIaseA,且随温度变化波动较大,耐热性较差。

温度稳定性测试结果如图 5 所示,当温度低于 50 °C 时,EcMIaseA 表现出较好的稳定性。当 EcMIaseA 在 30、40、50 °C 保温 1.5 h,甘露糖产量为 32.00、25.44、16.80 mmol/L,残余酶活分别为 66.5%、53.0%、35.0%。相较而言,热处理对 ThMIaseA、PgMIaseA、PsMIaseA 酶活影响更大,PstMIaseA 和 SsMIaseA 热处理后的酶活很低。

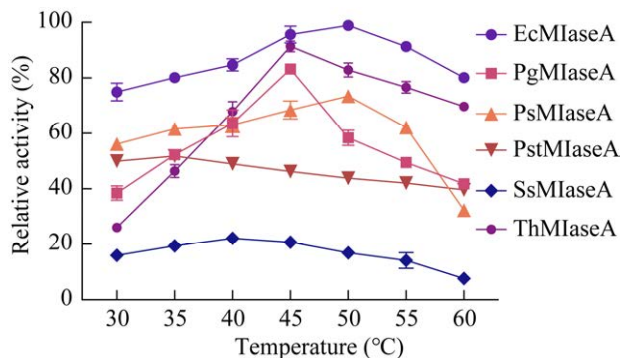


图4 温度对不同来源甘露糖异构酶酶活的影响
Figure 4 Effect of temperature on the activity of MIaseA from different sources.

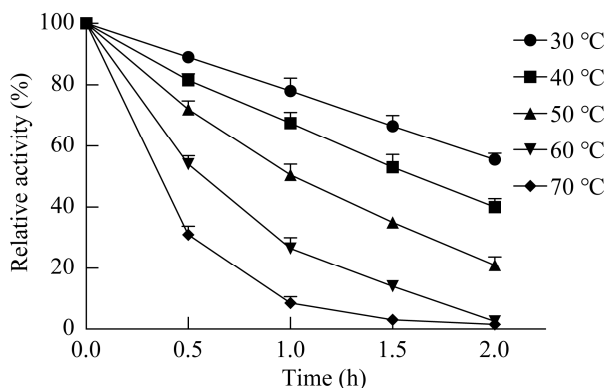


图5 EcMIaseA 的热稳定性
Figure 5 Temperature stability of EcMIaseA.

2.2.2 pH 对 MIaseA 酶活力和稳定性的影响

如图6所示, pH 过高或过低均会严重影响 MIaseA 酶活水平。当 pH 9.0 时, 6 种不同来源的甘露糖异构酶酶活均达到最高值, 其中 EcMIaseA 酶活水平整体高于其他来源的 MIaseA, 在最适 pH 9.0 条件下, 果糖消耗量约 54 mmol/L, 甘露糖产量约为 48 mmol/L, 转化率约为 24%。在 pH 8.0–10.0 范围内相对酶活仍保持在 80% 以上, pH 8.0 和 pH 10.0 时仍保持较高的转化率, 分别为 19.3% 和 21.4%。综合考虑, 选择 EcMIaseA 为后续实验研究对象。

接下来测试不同 pH 条件下处理 30 min 对

EcMIaseA 酶活力的影响, 结果如图7所示, pH 7.0–9.0 范围内仍保持 90% 以上的酶活性, 具有较好的 pH 稳定性。

2.3 EcMIaseA 在枯草芽孢杆菌中的表达

pMA5 启动子是组成型启动子, 不添加诱导剂即可实现外源基因 *EcMIaseA* 在食品安全菌株枯草芽孢杆菌的持续稳定表达。重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMIaseA* SDS-PAGE 分析结果如图8所示, *EcMIaseA* 在约 43 kDa 大小处有清晰条带加粗, 即 *EcMIaseA* 在 *B. subtilis* 168 中成功表达。

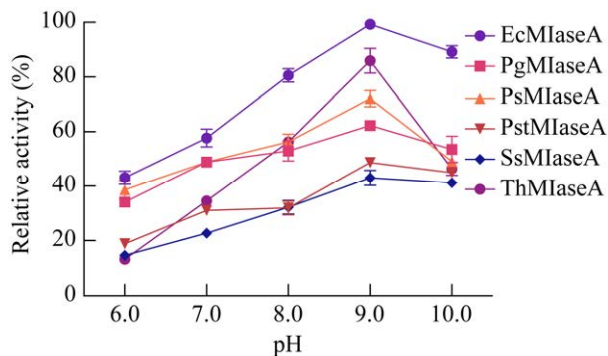


图6 pH 对不同来源甘露糖异构酶酶活的影响
Figure 6 Effect of pH on the activity of MIaseA from different sources.

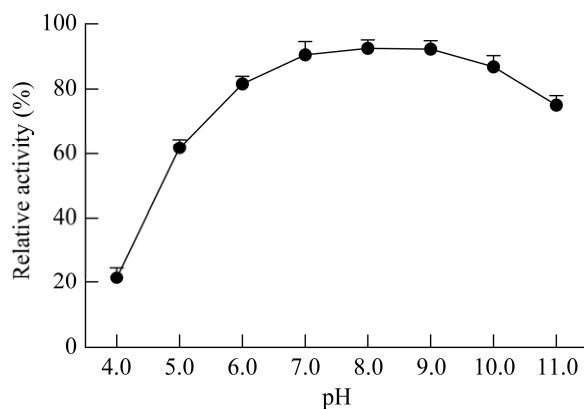


图7 EcMIaseA 的 pH 稳定性
Figure 7 pH stability of EcMIaseA.

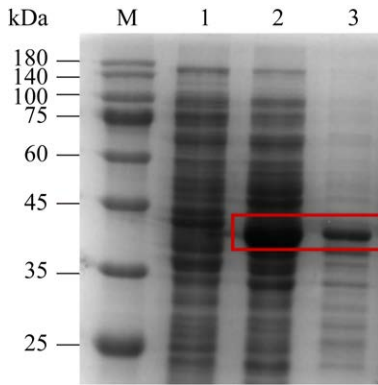


图 8 甘露糖异构酶在枯草芽孢杆菌中的表达

Figure 8 Expression of mannose in *Bacillus subtilis* 168. Lane M: Protein marker; Lane 1: *B. subtilis* 168/pMA5 cell breaking supernatant; Lane 2: *E. coli* BL21/pMA5-*EcMlaseA* cell breaking supernatant; Lane 3: *E. coli* BL21/pMA5-*EcMlaseA* cytoplasmic precipitation.

2.4 *Bacillus subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 全细胞转化的条件优化

2.4.1 全细胞转化合成 D-甘露糖的最适转化温度

转化温度为 50 °C 时, 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 的酶活力最高, 如图 9 所示, 可转化 600 g/L 的底物果糖生成 160.8 g/L 的甘露糖, 转化率达到 26.8%。转化温度低于 50 °C 时, 菌株的生长代谢速度会下降, 转化率变低; 而转化温度高于 50 °C 时, 由于菌株的热稳定性不佳, 随着温度的升高, 酶活性会逐渐下降。

2.4.2 全细胞转化合成 D-甘露糖的最适初始 pH

初始 pH 9.0 条件下重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA* 酶活力最高, 如图 10 所示, 以 600 g/L 果糖为底物, 可生成 160.74 g/L 甘露糖, 转化率为 26.8%。当 pH 在 8.0–11.0 范围内时, 转化率仍保持在 20% 以上。而初始 pH 低于 8.0 时, 酶活性较低, 转化率也较低。

2.4.3 全细胞转化合成 D-甘露糖的最适菌体量

如图 11 所示, OD_{600} 小于 70 时, 随着菌体量的增加, 转化率升高; 在 OD_{600} 为 70 时, 转化率

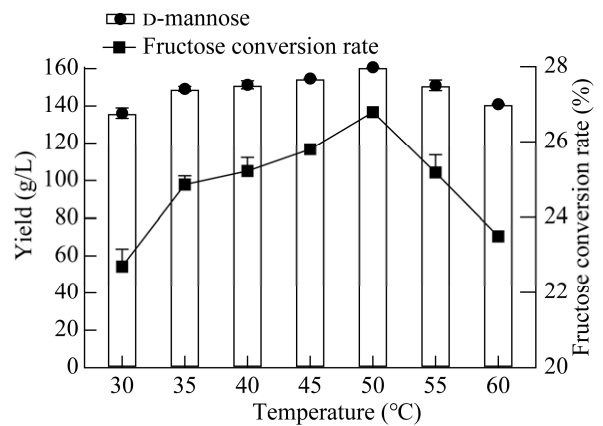


图 9 转化温度对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响
Figure 9 Effect of temperature on the synthesis of D-mannose by whole cell transformation.

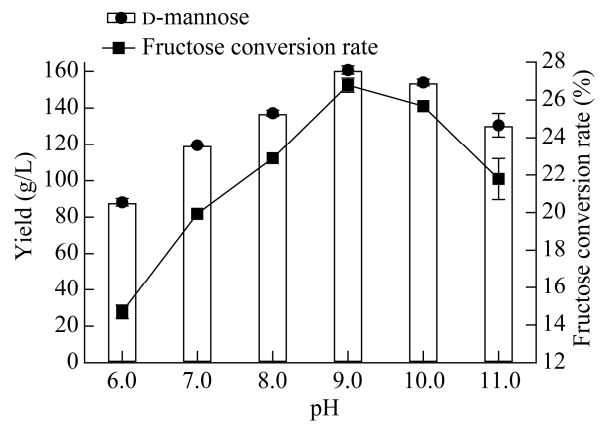


图 10 pH 对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响
Figure 10 Effect of pH on the synthesis of D-mannose by whole cell transformation.

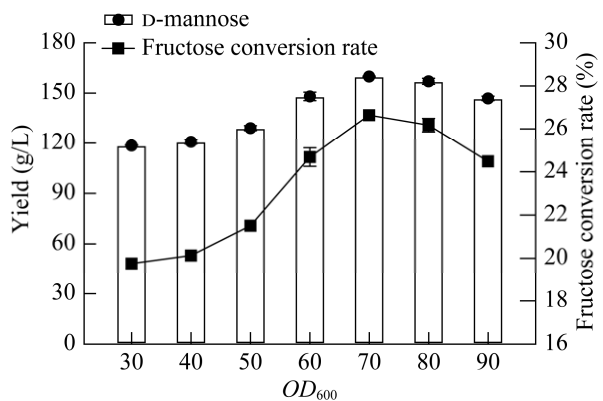


图 11 菌体密度 OD_{600} 对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响

Figure 11 Effect of cell density (OD_{600}) on the synthesis of D-mannose by whole cell transformation.

到达顶峰; OD_{600} 大于 70 时, 菌体量继续增加, 转化率没有继续增加, 可能是转化过程中菌体为了维持自身基本的生命活动消耗了一些底物。

2.4.4 全细胞转化合成 D-甘露糖的最适底物浓度

如图 12 所示, 随着底物浓度的增加, 甘露糖的产量逐渐升高, 但果糖转化率先升高后降低。当底物果糖浓度为 500 g/L 时, 甘露糖产量为 133.6 g/L, 转化率为 26.72%; 当底物果糖浓度为 600 g/L 时, 甘露糖产量为 155.4 g/L, 转化率为 25.90%。当底物果糖浓度为 700 g/L 时, 虽然甘露糖产量高达 167.2 g/L, 但转化率较低, 为 23.89%。

2.4.5 金属离子对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响

研究了 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 等二价金属离子对转化体系酶催化活力的影响, 在转化温度 50 °C、pH 9.0、 OD_{600} 为 70 的条件下, 添加 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 转化 6 h 后, 酶活力测定结果见表 2。适量添加 Mg^{2+} 对甘露糖的合成有微弱的促进作用; 而添加 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} , 转化量都受到了不同程度的抑制, 说明大肠杆菌来源的甘露糖异构酶不是金属离子依赖型酶。

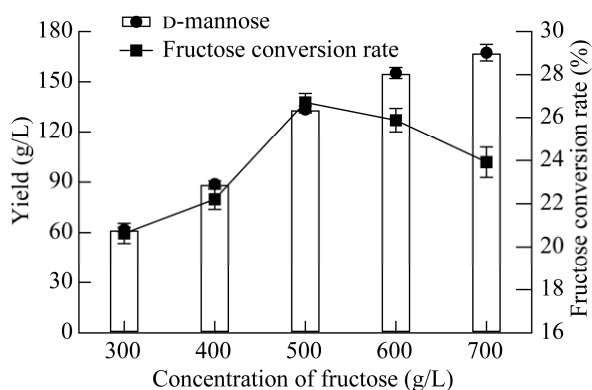


图 12 底物浓度对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响

Figure 12 Effect of substrate concentration on the synthesis of D-mannose by whole cell transformation.

表 2 金属离子对酶活性的影响

Table 2 Effect of metal ions on the activity of the enzymes

Metal ions	Concentration (mmol/L)			
	0.5	1.0	3.0	5.0
Blank	100	100	100	100
Mg^{2+}	106.82±2.54	102.20±1.32	101.01±0.80	100.20±1.24
Ca^{2+}	94.12±1.85	90.24±2.98	81.03±2.37	76.90±0.86
Mn^{2+}	62.89±0.48	53.51±0.34	40.10±0.98	23.72±0.82
Co^{2+}	47.30±1.21	32.92±0.44	20.36±0.45	11.68±1.39
Ni^{2+}	29.34±2.02	16.20±1.82	8.92±2.33	4.86±0.75
Cu^{2+}	12.26±1.11	4.70±0.98	2.83±0.77	1.98±0.63
Zn^{2+}	3.57±0.18	2.65±0.54	1.02±0.39	0.71±0.62

2.5 细胞重复批次对全细胞转化合成 D-甘露糖的影响

如图 13 所示, 随着转化次数增加, 酶活逐渐下降。重复转化 10 次甘露糖产量仍有 111.39 g/L, 转化率仍高达 20.04%, 以第一次转化酶活为 100%, 转化第 10 次酶活仍有初始酶活的 80% 以上, 转化 10 次以上酶活才显著下降, 重复转化 11 次, 甘露糖产量为 107.46 g/L, 重复转化 12 次, 甘露糖产量为 93.42 g/L。

2.6 5 L 发酵罐放大合成 D-甘露糖

为验证 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMIaseA* 在大

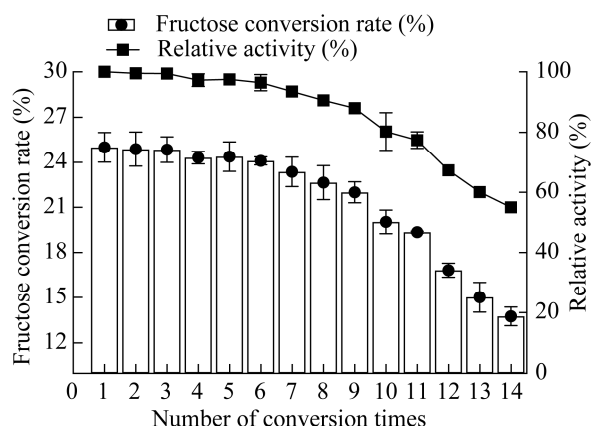


图 13 重复批次全细胞转化的相对酶活及果糖转化率

Figure 13 Relative activity and fructose conversion rate of repeated-batch whole cell transformation.

体系中的转化水平, 尝试在 5 L 发酵罐中进行全细胞转化, 转化缓冲液为 20 mmol/L、pH 9.0 的 Tris-HCl, 控制 $OD_{600}=70$ 、转化温度 50 °C、搅拌转速 200 r/min, 全程不进行 pH 控制。以 500 g/L 果糖为底物, 转化 6 h, 可生成 138.74 g/L 甘露糖, 转化率为 27.75% (图 14A); 以 600 g/L 果糖为底物, 转化 6 h, 可生成 163.30 g/L 甘露糖, 转化率为 27.22% (图 14B)。6 h 以后反应逐渐减慢, 趋于平稳, 转化率几乎无变化。

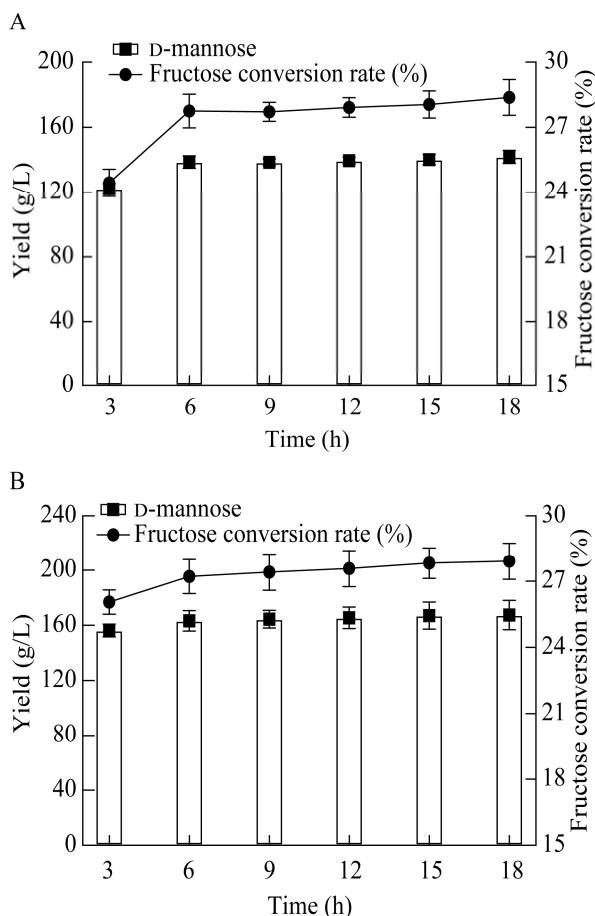


图 14 5 L 发酵罐中以 500 g/L 果糖(A)和 600 g/L 果糖(B)为底物全细胞转化结果

Figure 14 Whole cell transformation results with 500 g/L fructose (A) and 600 g/L fructose (B) as substrate in 5 L fermentor.

3 讨论与结论

本研究通过文献调研结合 NCBI 的 BLAST 对甘露糖异构酶来源进行挖掘, 选取了 6 个不同来源的甘露糖异构酶克隆至大肠杆菌进行异源表达, 探究其酶学性质, 确定最优来源为大肠杆菌, 之后将大肠杆菌来源的甘露糖异构酶编码基因 *EcMlaseA* 导入食品安全级菌株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168, 成功构建了重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*EcMlaseA*, 用于 D-甘露糖的安全高效合成。利用优化后的全细胞转化条件, 在 50 °C、pH 9.0、菌体 OD_{600} 为 70、底物果糖浓度 500 g/L 的条件下, 在 5 L 发酵罐进行全细胞转化 6 h 后, 生成 D-甘露糖 138.74 g/L, 果糖转化率约 27.75%; 以 600 g/L 果糖为底物, 转化 6 h, 可生成 163.30 g/L 甘露糖, 果糖转化率达到 27.22%, 是目前报道的利用重组枯草芽孢杆菌催化合成 D-甘露糖的最高产量。为拓宽 D-甘露糖在食品、医药领域的应用, 本研究利用食品安全级菌株枯草芽孢杆菌合成 D-甘露糖, 相较大肠杆菌更安全环保; 此外采取全细胞转化法相较于酶法合成优化了工艺流程, 减少了操作复杂性, 可重复批次转化, 节省了生产成本, 具有更好的经济效益。

本研究所构建的重组枯草芽孢杆菌, 实现了全细胞高效转化合成甘露糖, 相关研究方法和结果为后续 D-甘露糖的工业化生产及应用提供参考。后续可以针对甘露糖异构酶的热稳定性及酶活进行理性改造, 进一步提升催化能力, 还可以通过元件优化, 如启动子、RBS 优化或多基因拷贝等策略来强化甘露糖异构酶的表达, 提高转化效率, 获得工业属性较优的生产菌株。同时探索细胞固定化增加菌体的重复利用次数以及构建以葡萄糖为底物高效合成菌株, 进一步降低生产成本, 实现甘露糖的经济、安全、高效生产。

REFERENCES

- [1] WANG EJ, HAN R, WU MY, HE Y, CHENG YX, LU JH, ZHENG Y. Size-dependent macrophage-targeting of mannose-modified rosiglitazone liposomes to alleviate inflammatory bowel disease[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2024, 35(1): 108361.
- [2] 张聪. 基于巨噬细胞代谢重编程探讨 D-甘露糖治疗大鼠类风湿性关节炎的疗效及机制[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2023.
- ZHANG C. Discussion on the therapeutic effect and mechanism of D-mannose in the treatment of rheumatoid arthritis in rats based on macrophage metabolic reprogramming[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2023 (in Chinese).
- [3] ZHANG DF, CHIA C, JIAO X, JIN WW, KASAGI S, WU RQ, KONKEL JE, NAKATSUKASA H, ZANVIT P, GOLDBERG N, CHEN QM, SUN LY, CHEN ZJ, CHEN WJ. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology[J]. *Nature Medicine*, 2017, 23: 1036-1045.
- [4] NAN F, SUN YT, LIANG HT, ZHOU JY, MA X, ZHANG DF. Mannose: a sweet option in the treatment of cancer and inflammation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 877543.
- [5] DENG YL, LIU R, CAI ZD, HAN ZD, FENG YF, CAI SH, CHEN QB, ZHU JG, ZHONG WD. Mannose inhibits the growth of prostate cancer through a mitochondrial mechanism[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2022, 24(5): 540-548.
- [6] de GRAEF D, MOUSA J, WABERSKI MB, MORAVA E. Mannose treatment improves immune deficiency in mannose phosphate isomerase-congenital disorder of glycosylation: case report and review of literature[J]. *Therapeutic Advances in Rare Disease*, 2022, 3: 26330040221091283.
- [7] KAMEL MM, ALI HI, ANWAR MM, MOHAMED NA, SOLIMAN AM. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(2): 572-580.
- [8] 杜思南, 赵丽曼, 张泽新, 陈国颂. 甘露糖修饰的微马达的制备及其免疫功能初探[J]. *化学学报*, 2023, 81(7): 741-748.
- DU SN, ZHAO LM, ZHANG ZX, CHEN GS. Preparation and preliminary study on immune function of mannose-modified micromotor[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2023, 81(7): 741-748 (in Chinese).
- [9] 倪妮妮, 胡超群, 白福来, 季文娜, 张茜. D-甘露糖生产工艺及生理功能研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(17): 458-465.
- NI WW, HU CQ, BAI FL, JI WN, ZHANG Q. Research progress on the production technology and physiological function of D-mannose[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(17): 458-465 (in Chinese).
- [10] REYES P, MENDONÇA R, AGUAYO MG, RODRIGUEZ J, VEGA B, FARDIM P. Extraction and characterization of hemicelluloses from *Pinus radiata* and its feasibility for bioethanol production[J]. *Revista Arvore*, 2013, 37: 175-180.
- [11] 赵光辉, 王关斌, 李俊平, 曹玉华. 葡萄糖催化制取甘露糖的正交试验分析[J]. *当代化工*, 2005, 34(1): 39-41.
- ZHAO GH, WANG GB, LI JP, CAO YH. The orthogonal experiment analysis on the producing mannose from dextrose by catalyzing effect of ammonium molybdate[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2005, 34(1): 39-41.
- [12] 陈铭, 吴昊, 张文立, 沐万孟. 弱酸特性 D-来苏糖异构酶分子改造及 D-甘露糖生产[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 129-137.
- CHEN M, WU H, ZHANG WL, MU WM. Molecular modification of D-lyxose isomerase with weak acid characteristic and D-mannose production[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(17): 129-137 (in Chinese).
- [13] NGUYEN QA, CHO E, TRINH LTP, JEONG JS, BAE HJ. Development of an integrated process to produce D-mannose and bioethanol from coffee residue waste[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(Pt 1): 1039-1048.
- [14] 张伟, 章朝晖, 梁光兴. 提高葡萄糖差向异构转化生成甘露糖收率的研究[J]. *化工技术与开发*, 2017, 46(3): 18-21.
- ZHANG W, ZHANG CH, LIANG GX. Study on increasing yield of mannose from glucose by epimerization conversion[J]. *Technology & Development of Chemical Industry*, 2017, 46(3): 18-21 (in Chinese).
- [15] HU X, SHI YN, ZHANG P, MIAO M, ZHANG T, JIANG B. D-mannose: properties, production, and applications: an overview[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, 15(4): 773-785.
- [16] 沈玲, 赵丽婷, 沈昱, 陈磊, 李军训, 顾正华, 李由然, 石贵阳, 丁重阳. D-甘露糖异构酶的酶学性质探究和热稳定性改造[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(24): 103-110, 124.
- SHEN L, ZHAO LT, SHEN Y, CHEN L, LI JX, GU ZH,

- LI YR, SHI GY, DING ZY. Characterization and thermostability modification of D-mannose isomerase[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(24): 103-110, 124 (in Chinese).
- [17] 华晓晗, 李延啸, 马俊文, 刘海杰, 闫巧娟, 江正强. 链霉菌来源 D-甘露糖异构酶的性质及其在制备 D-甘露糖中的应用[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1930-1941.
- HUA XH, LI YX, MA JW, LIU HJ, YAN QJ, JIANG ZQ. Characterization of a D-mannose isomerase from *Streptomyces* sp. and its application in the preparation of D-mannose[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 1930-1941 (in Chinese).
- [18] PARK CS, KIM JE, CHOI JG, OH DK. 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] SABURI W, SATO S, HASHIGUCHI S, MUTO H, IIZUKA T, MORI H. Enzymatic characteristics of D-mannose 2-epimerase, a new member of the acylglucosamine 2-epimerase superfamily[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(16): 6559-6570.
- [20] HUA XH, LI YX, JIANG ZQ, MA JW, LIU HJ, YAN QJ. Biochemical properties of a novel D-mannose isomerase from *Pseudomonas syringae* for D-mannose production[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2021, 193(5): 1482-1495.
- [21] HIROSE J, KINOSHITA Y, FUKUYAMA S, HAYASHI S, YOKOI H, TAKASAKI Y. Continuous isomerization of D-fructose to D-mannose by immobilized *Agrobacterium radiobacter* cells[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(4): 349-352.
- [22] KASUMI T, MORI S, KANEKO S, MATSUMOTO H, KOBAYASHI Y, KOYAMA Y. Characterization of mannose isomerase from a cellulolytic actinobacteria *Thermobifida fusca* MBL10003[J]. Journal of Applied Glycoscience, 2014, 61(1): 21-25.
- [23] ZHAO L, TIAN RZ, SHEN QY, LIU YF, LIU L, LI JH, DU GC. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced N-acetylneuraminic acid production via whole-cell biocatalysis[J]. Biotechnology Journal, 2019, 14(7): 1800682.
- [24] MOON S, KONG B, JUNG YH, KIM Y, YU S, PARK JB, SHIN J, KWEON DH. Endotoxin-free purification of recombinant membrane scaffold protein expressed in *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2018, 66: 230-236.
- [25] HU X, ZHANG P, MIAO M, ZHANG T, JIANG B. Development of a recombinant D-mannose isomerase and its characterizations for D-mannose synthesis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89: 328-335.
- [26] 李影. 来源于 *Pseudomonas geniculata* 的 AGE family epimerase/isomerase 在大肠杆菌中的表达及其在 D-甘露糖制备中的应用[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2019.
- LI Y. Expression of *Pseudomonas geniculata* AGE family epimerase/isomerase in *Escherichia coli* and its application in D-mannose preparation[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2019 (in Chinese).
- [27] PALLERONI NJ, DOUDOROFF M. Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*[J]. Biological Chemistry, 1956, 218(1): 535-548.
- [28] TAKASAKIY, TAKANO S. Studies on the isomerization of sugars by bacteria: part VIII. Purification and some properties of mannose isomerase from *Xanthomonas rubrilineans* S-48[J]. Agricultural Biological Chemistry, 1964, 28(9): 605-609.
- [29] Allenza P, Morrell M, Detroy R. Conversion of mannose to fructose by immobilized mannose isomerase from *Pseudomonas cepacia*[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 1990, 24(1): 171-182.

(本文责编 郝丽芳)