

• 生物育种与工艺优化 •

重组枯草芽孢杆菌全细胞催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷

段培枫, 尤甲甲, 徐美娟, 杨套伟, 邵明龙, 张显, 饶志明

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

段培枫, 尤甲甲, 徐美娟, 等. 重组枯草芽孢杆菌全细胞催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1918–1928.

Duan PF, You JJ, Xu MJ, et al. Whole-cell biosynthesis of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol by recombinant *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1918–1928.

摘要: 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷是一种在食品、化妆品、保健品及医药领域有着重大应用前景的高附加值产品, 但国内仍未实现 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的工业化生产, 且鲜有关于 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷合成的相关报道。文中旨在开发一种利用食品安全级重组枯草芽孢杆菌全细胞催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的方法, 通过构建一株异源表达肠膜明串珠菌蔗糖磷酸化酶 (Sucrose phosphorylase, SPase) 的重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 并将其用作全细胞催化剂合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 通过优化培养温度、时间及全细胞转化条件, 提高其转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的产量。结果表明, 重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 在 30 °C 下培养 20 h, 菌体裂解物酶活力最大达 1.43 U/mL, 并且在 1 mol/L 蔗糖、2.5 mol/L 甘油、pH 7.0、菌体 OD_{600} 为 40、30 °C 下全细胞转化反应 48 h, 共生成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷 189.3 g/L, 平均转化速率为 15.6 mmol/(L·h), 蔗糖转化率约为 75.1%, 是目前报道的利用重组枯草芽孢杆菌催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的最高产量, 这为 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的工业化生产及应用奠定了理论和实验基础。

关键词: 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 异源表达, 枯草芽孢杆菌, 蔗糖磷酸化酶, 全细胞催化

Received: December 25, 2019; **Accepted:** March 17, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2018YFA0900304), Scientific and Technological Innovation Leading Talents of National “Ten Thousand Talent Program”, Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2017BY069).

Corresponding authors: Zhiming Rao. Tel: +86-510-85916881; E-mail: raozm@jiangnan.edu.cn

Xian Zhang. E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

国家重点研发计划 (No. 2018YFA0900304), “万人计划”科技创新领军人才, 宁夏回族自治区重点研发计划 (No. 2017BY069) 资助。

网络出版时间: 2020-05-08

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200508.1432.003.html>

Whole-cell biosynthesis of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol by recombinant *Bacillus subtilis*

Peifeng Duan, Jiajia You, Meijuan Xu, Taowei Yang, Minglong Shao, Xian Zhang, and Zhiming Rao

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

Abstract: 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol is a high value-added product with prospective application in food, cosmetics, health products and pharmaceutical industries. However, industrial scale of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol has not yet been applied in China, and there are few related reports on 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol synthesis. The purpose of this experiment is to develop a method for catalyzing the synthesis of food-grade 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol using whole cells of “Generally Recognized as Safe” (GRAS) recombinant *Bacillus subtilis*. In our work, a recombinant *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* that heterologously expressing *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase was constructed and used as a whole-cell catalyst to synthesize 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol. Optimizing the culture temperature, time and whole cell transformation conditions has increased the yield of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol. The results showed that 1.43 U/mL of sucrose phosphorylase was achieved in *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* after culturing for 20 h at 30 °C in fermentation medium. The highest conversion rate reached 75.1%, and the yield of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol was 189.3 g/L with an average transformation rate of 15.6 mmol/(L·h) after 48 hours whole-cell transformation with the sucrose concentration of 1 mol/L and the glycerol concentration of 2.5 mol/L at 30 °C, OD_{600} 40 and pH 7.0. This is the highest yield of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol synthesized catalytically by recombinant *B. subtilis* that was ever reported, and this study provides the theoretical and experimental basis for the industrial production and application of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol.

Keywords: 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol, heterologous expression, *Bacillus subtilis*, sucrose phosphorylase, whole cell catalysis

2-O- α -D-甘油糖苷 (2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol) 是一种由一个葡糖基和一个甘油基通过糖苷键连接的糖苷类物质^[1], 在自然界广泛存在, 特别是在耐盐的蓝细菌^[2]和南非密罗木中, 它是密罗木能在极端环境中生存和重新激活复生的最主要的活性物质^[3]; 另外, 在日本清酒中也发现含有活性成分 2-O- α -D-甘油糖苷^[4]。2-O- α -D-甘油糖苷对生物体具有保护作用, 当细胞处在高渗透压、强紫外线或干旱等恶劣条件下时, 它能在细胞表面形成保护膜, 从而有效防止蛋白质分子变性、失活^[5], 因此, 2-O- α -D-甘油糖苷可作为蛋白质和酶的稳定剂^[6-7]。此外, 由于其高保湿性、低吸水性的特点, 2-O- α -D-甘油糖苷常被用作化妆品原料, 以提高皮肤的保湿效果^[8-9]; 2-O- α -D-

甘油糖苷还可以作为一种无致龋性的甜味剂添加到食品中^[10]。因此, 2-O- α -D-甘油糖苷在化妆品、食品、医药^[11-12]、保健品^[13]等领域发挥着重要作用, 具有广阔的应用和市场前景; 但截至目前, 德国的 Bitop AG 公司是唯一一家在工业规模上实现了 2-O- α -D-甘油糖苷生产的公司^[14], 而国内关于 2-O- α -D-甘油糖苷的产业化仍处于起步、探索阶段。

2-O- α -D-甘油糖苷具有多种合成方式, 主要包括化学法合成、微生物合成和酶转化合成^[15]。化学法合成的产物中由于存在多种同分异构体^[4], 需多步纯化, 2-O- α -D-甘油糖苷产率较低, 工艺复杂^[10], 一般不在工业上采用。微生物合成法^[2]是指利用经基因改造后的蓝细菌等微生物在盐胁迫

迫条件下进行光合作用合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷^[16], Martin 等曾经报道了利用嗜根寡养单胞菌 *Stenotrophomonas rhizophilastrain* DSM14405 合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 但产量仅约为 29 mg/L^[17]。近些年一些学者通过分子改造和胁迫培养条件的优化^[18], 提高了生物体内合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的产量, 但据报道最高产量也仅约为 0.3 g/L^[19], 仍不具工业应用价值。酶转化法包括 α -葡萄糖苷酶转化法和蔗糖磷酸化酶转化法^[15]。 α -葡萄糖苷酶转化法是以麦芽糖和甘油为底物, 通过 α -葡萄糖苷酶的转糖基化, 进行体外酶促合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的方法, 转化产物是包括 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷在内的 3 种不同立体异构体的混合物^[10], 分离纯化较为困难, 生产成本低, 不利于大规模生产; 蔗糖磷酸化酶转化法是奥地利学者 Goedl 等将蔗糖磷酸化酶基因在大肠杆菌中克隆表达, 以蔗糖和甘油为底物, 建立的一种酶促合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的方法^[20], 这种方法具有底物原料低廉、产物简单的优点, 但也存在转化时间长、体外条件下酶的稳定性差、容易失活等问题, 同时大肠杆菌作为宿主菌的安全性问题^[21-22], 这都限制了 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷在食品、药品领域的工业化应用。

本研究首先将来源于肠膜明串珠菌 *Leuconostoc mesenteroides* 的蔗糖磷酸化酶基因 (*gtfA*) 在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中克隆表达, 然后通过 Ni-NTA 亲和柱对目标产物进行纯化, 收集 SPase 纯酶并测定其酶学性质, 再将 *gtfA* 基因导入食品安全级枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中, 构建重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 通过优化培养

条件, 改善重组酶在胞内的表达水平, 并将重组枯草芽孢杆菌作为全细胞催化剂以蔗糖和甘油为底物合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 反应式如图 1 所示。这也是首次将枯草芽孢杆菌全细胞催化的方法应用于 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的合成, 同时通过全细胞转化条件优化, 获得了较高的蔗糖转化率和 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷产量, 这为 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的工业化生产提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168、大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 及质粒 pMA5、pET-28a 均为本实验室保藏。

1.1.2 酶和试剂

*Bam*H I、*Xho* I 等限制性核酸内切酶与 DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司; 小量质粒提取试剂盒、同源重组试剂盒和胶回收试剂盒购于南京诺维赞生物科技有限公司; 2-O- α -D-甘油葡萄糖购于德国 Bitop AG 公司; 蔗糖、甘油和果糖等分析纯试剂均购于上海麦克林生化科技有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L。

发酵培养基: 葡萄糖 60 g/L, 酵母粉 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 七水合硫酸镁 2 g/L, 尿素 3 g/L, 磷酸二氢钾 5 g/L, 磷酸氢二钾 5 g/L, 硫酸锌 0.143 g/L, 柠檬酸钠 5 g/L; pH 7.0–7.2。

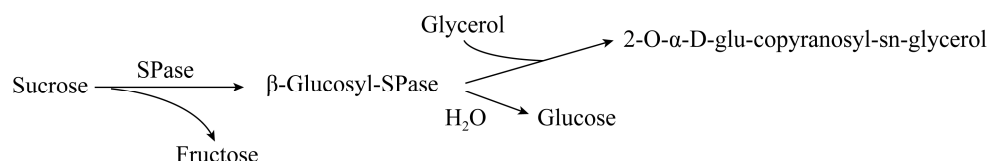


图 1 蔗糖磷酸化酶催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷^[23]

Fig. 1 Synthesis of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol catalyzed by sucrose phosphorylase^[23].

1.2 方法

1.2.1 引物设计

通过 NCBI 数据库获得编码肠膜明串珠菌蔗糖磷酸化酶的基因序列,选择合适的酶切位点,设计并合成两对同源臂引物,序列参见表 1。

1.2.2 构建重组表达菌株

以肠膜明串珠菌基因 *gtfA* 为模板, pET-28a-SP-F 和 pET-28a-SP-R 为引物,PCR 扩增,并用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切质粒 pET-28a,胶回收酶切产物和 PCR 产物后用同源重组试剂盒进行连接,然后将连接产物转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞,涂布浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 抗性平板过夜培养,挑取阳性转化子,送苏州金唯智生物科技有限公司测序,若测序正确,即重组菌株 *E. coli* BL21/pET-28a-*gtfA* 构建成功。以基因 *gtfA* 为模板, pMA5-SP-F 和 pMA5-SP-R 为引物,PCR 扩增,并用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 酶切质粒 pMA5,将酶切产物与 PCR 产物经同源重组连接后转化入 *E. coli* BL21 感受态细胞,涂布浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 抗性平板过夜培养,挑选测序正确的菌株,抽提质粒 pMA5-*gtfA*,转化到 *B. subtilis* 168 感受态细胞中,涂布浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 抗性平板过夜培养,挑取阳性转化子,送苏州金唯智生物科技有限公司测序,若测序正确,即重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 构建成功。

1.2.3 Spase 在大肠杆菌中的表达和纯化

挑重组菌 *E. coli* BL21/pET-28a-*gtfA* 于 10 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 11–12 h 后,以 3% (V/V) 的接种量转接 100 mL LB 培养基,培养至 OD_{600} 达 0.8–1.0 时,加入 IPTG 诱导后,25 $^{\circ}$ C 培养 11–12 h,离心收集菌体,缓冲液悬浮后进行超声

破碎,将裂解液低温离心,所得上清即重组菌粗酶液。将粗酶液用 0.2 μ m 滤膜过滤处理,经 Ni-NTA 亲和柱纯化后收集 SPase 纯酶,测定其酶学性质。

1.2.4 Spase 在枯草芽孢杆菌中的表达

挑重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 于 10 mL LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 11–12 h 后,以 2% (V/V) 的接种量转接 100 mL 发酵培养基中,30 $^{\circ}$ C 培养 20 h 后离心收集菌体,超声破碎后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.5 酶活测定

酶活测定体系为 1 mL,其中蔗糖 0.4 mol/L,甘油 1 mol/L, MES 缓冲液 (pH 7.0) 50 mmol/L, 50 μ g 纯酶,35 $^{\circ}$ C 下反应 30 min,煮沸 10 min 终止反应。将反应液用 0.2 μ m 滤膜过滤,稀释后进行 HPLC 检测。检测条件为^[20]: Agilent Hi-Plex Ca 色谱柱, RID 检测器,超纯水作流动相,柱温 85 $^{\circ}$ C,流速 0.6 mL/min。酶活定义为:每 1 min 生成 1 μ mol 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷所需的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

1.2.6 酶的最适温度的测定

将酶反应体系分别在 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 的条件下测定酶活,确定酶反应的最适温度,设置酶活最高组为 100% 对照。

1.2.7 酶的最适 pH 的测定

将酶反应体系分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的条件下测定酶活,确定酶反应的最适 pH,设置酶活最高组为 100% 对照。其中 3 种不同的缓冲体系:柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.0–6.0)、MES 缓冲液 (pH 6.0–8.0) 和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 8.0–10.0)。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
pET-28a-SP-F	TGGTGGTGGTGGTGC TCGAGATGGA ATTCAAAATAAAGCAA	42
pET-28a-SP-R	AGCAAAATGGGTCGCGGATCCTTACAATTGTTGCTTATCAGCT	42
pMA5-SP-F	AAGTGAAATCAGGGGGATCCATGGAAATTCAAAATAAAGCA	41
pMA5-SP-R	CTGGTACGTACCAAGCTAGCTTACAATTGTTGCTTATCAGCT	42

The italic sequences are the restriction enzyme cutting sites.

1.2.8 酶的温度稳定性的测定

取纯酶分别置于 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 的条件下保温, 定时取样测定残余酶活, 设置初始酶活为 100% 对照。

1.2.9 酶的 pH 稳定性的测定

取纯酶分别置于 pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 的缓冲液中, 保持 2 h 后, 测定残余酶活, 以测得残余酶活最高组为 100% 对照。

2 结果与分析

2.1 肠膜明串珠菌蔗糖磷酸化酶基因 *gtfA* 的克隆与表达

从 NCBI 数据库中检索到肠膜明串珠菌蔗糖磷酸化酶的序列, 长度为 1 479 bp, 合成该序列并作为模板, 进行 PCR 扩增, 电泳结果如图 2A 所示, 可见特异性条带位置与目标基本一致。按照方法 1.2.2 构建重组菌株 *E. coli* BL21/pET-28a-*gtfA*, 细胞破碎后, SDS-PAGE 分析结果见图 2B, 重组菌裂解物上清在约 56 kDa 位置表达有明显的蛋白质特征条带, 与报道中的分子量一致^[24], 且经 Ni-NTA 亲和柱纯化后的重组蛋白在相应大小位置也有单一条带, 这表明基因 *gtfA* 在大肠杆菌中成功表达。

2.2 温度和 pH 对 SPase 酶活力和稳定性的影响

2.2.1 温度对 SPase 酶活力和稳定性的影响

在不同温度下测定 SPase 的酶活力, 结果如

图 3A 所示, 酶的最适反应温度为 35 °C, 在 20–45 °C 之间时具有较高酶活力, 当温度超过 45 °C 时, 酶活力开始迅速下降。研究温度对 SPase 稳定性的影响, 结果见图 3B, 可以看出, SPase 在 30 °C、35 °C 保温 120 min 后的残余酶活力仍然高于 80%, 而在 45 °C 保温 80 min 后的残余酶活力几乎为零, 这表明它在 30–35 °C 范围内有较好的稳定性。

2.2.2 pH 对 SPase 酶活力和稳定性的影响

在不同 pH 下测定 SPase 的酶活力, 结果见图 4A。可以看出, 酶的最适反应 pH 为 7.0, 在 pH 处于 6.0–8.0 之间时具有较高酶活力。研究 pH 对 SPase 稳定性的影响, 结果见图 4B, SPase 在 pH 6.0–7.0 下保持 2 h 后的残余酶活力仍在 90% 以上, 表明其在此 pH 范围内有较好的稳定性。

2.3 SPase 在枯草芽孢杆菌中的表达

枯草芽孢杆菌通常被认为是一种食品安全级菌种, 因此我们选择枯草芽孢杆菌作为宿主, 用来开发 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷合成的全细胞生物催化方法。按照 1.2.2 中的方法构建重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 加入溶菌酶后超声破碎, SDS-PAGE 分析结果如图 5 所示, 重组菌破壁上清在约 56 kDa 大小处表达有清晰的蛋白条带, 即表明 SPase 在宿主 *B. subtilis* 168 中成功表达。

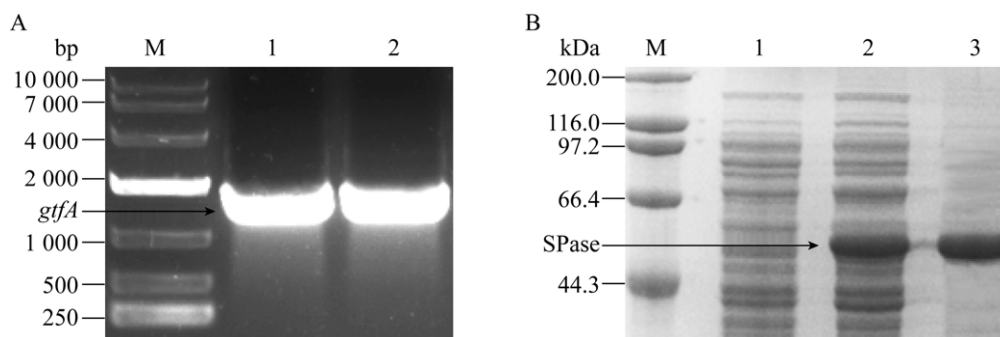


图 2 *gtfA* 基因的克隆 (A)、表达及纯化分析 (B)

Fig. 2 The result of *gtfA* gene cloning (A), expression and purification (B). (A) Lane M: DL 10 000 marker; lane 1–2: Gene *gtfA*. (B) lane M: protein marker; lane 1: *E. coli* BL21/pET-28a crude enzyme; lane 2: *E. coli* BL21/pET-28a-*gtfA* crude enzyme; lane 3: purified SPase.

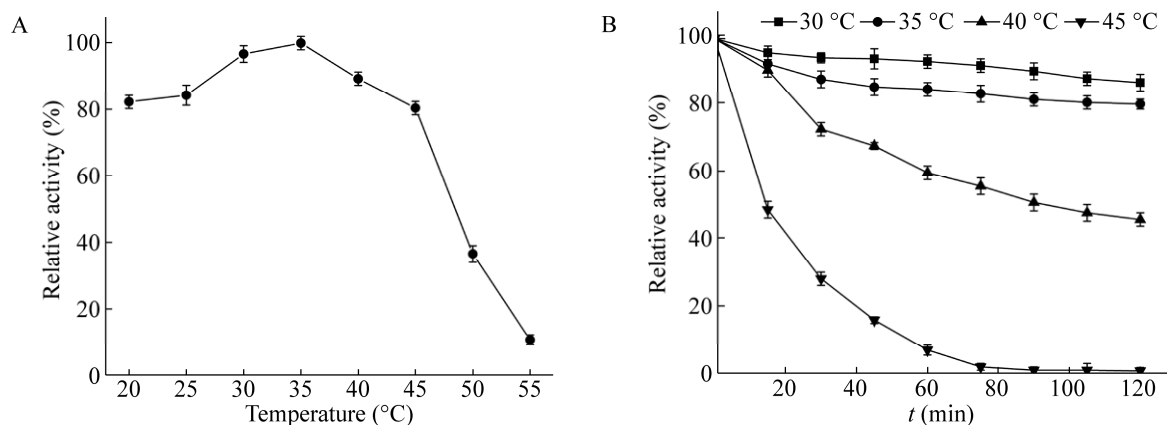


图 3 SPase 的最适温度 (A) 和温度稳定性 (B)

Fig. 3 Optimal temperature (A) and the temperature stability (B) of SPase.

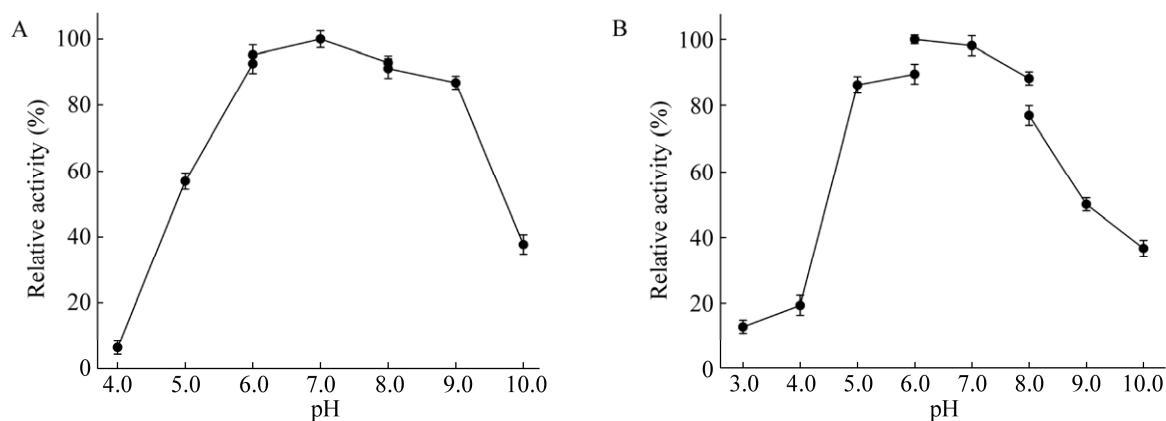


图 4 SPase 的最适 pH (A) 和 pH 稳定性 (B)

Fig. 4 Optimal pH (A) and the pH stability (B) of SPase. pH 3.0–6.0: citric acid-sodium citrate buffer; pH 6.0–8.0: MES buffer; pH 8.0–10.0: glycine-sodium hydroxide buffer.

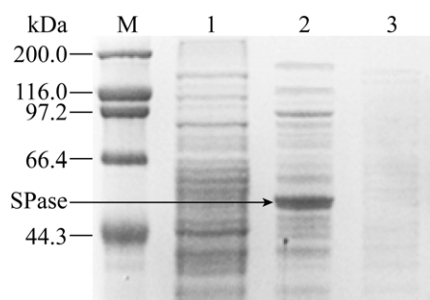


图 5 SPase 在枯草芽孢杆菌中的表达

Fig. 5 Expression of SPase in *B. subtilis*. M: protein marker; lane 1: *B. subtilis* 168/pMA5 crude enzyme; lane 2: *B. subtilis* 168/pMA5-gtfA crude enzyme; lane 3: *B. subtilis* 168/pMA5-gtfA fermentation broth.

2.4 优化 SPase 在枯草芽孢杆菌中的表达

为了后续利用构建的重组枯草芽孢杆菌作为全细胞催化剂来合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 通过优化菌株培养温度和培养时间, 改善 SPase 在宿主枯草芽孢杆菌的表达水平, 以提高重组菌全细胞催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的能力。

2.4.1 培养温度的优化

本研究所用 pMA5 质粒搭载的是一种组成型的启动子^[25], 不需要其他因子的诱导, 外源基因即可稳定表达, 但其在宿主菌中表达水平的高低, 会受环境因素的影响。按方法 1.2.4 接种重组菌

B. subtilis 168/pMA5-*gtfA*, 转接 100 mL 发酵培养基, 分别在 20 °C、25 °C、30 °C、35 °C 和 40 °C 下培养 16 h 后, 破碎细胞进行酶活力测定。结果显示 (图 6A), 在 30 °C 下培养时, 测得菌体裂解物的酶活力最高, 为 1.31 U/mL; 温度低于 30 °C 时, 菌株的生长代谢速度过慢, 表达量较低; 而培养温度高于 35 °C 时, 由于酶的热稳定性不佳, 在较高温度下, 酶活性会逐渐丧失, 所以测得的酶活也较低。

2.4.2 培养时间的优化

按方法 1.2.4 接种重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 转接 100 mL 发酵培养基后, 30 °C 分别培养 12、14、16、18、20、22、24 h 后, 破碎细胞进行酶活力测定。结果显示 (图 6B), 培养 20 h 时菌体裂解物酶活力达到最高, 为 1.43 U/mL; 继续延长培养时间, 酶活力并没有提高, 可能是在发酵后期, 其他代谢副产物的大量积累, 影响了目的酶的表达。

2.5 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的条件优化

2.5.1 温度对全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响

温度通过影响菌体状态和酶促反应的效率而影响 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的合成。按方法 1.2.4 接

种重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 转接发酵培养基, 30 °C 培养 20 h 后离心收集菌体, 进行全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷。控制初始反应 pH 7.0, 蔗糖 1 mol/L, 甘油 1 mol/L, 菌体 OD_{600} 为 20, 反应温度分别为 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 的条件下进行全细胞转化反应。结果如图 7A 所示, 全细胞转化反应温度为 30 °C 时, 蔗糖转化率最高, 达到 53.2%, 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷产量为 134.8 g/L; 在 45 °C 时, 蔗糖转化率较低, 仅为 28.4%。

2.5.2 初始 pH 对全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响

按方法 1.2.4 接种重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 转接发酵培养基, 30 °C 培养 20 h 后离心收集菌体, 进行全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 理论上转化反应过程中 pH 无明显变化, 探究初始 pH 对全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响。控制反应温度为 30 °C, 蔗糖浓度 1 mol/L, 甘油浓度 1 mol/L, 菌体 OD_{600} 为 20, 初始 pH 分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的条件下进行全细胞转化反应。结果如图 7B 所示, 在 pH 小于 7.0 时, 蔗糖转化率随 pH 的升高而增加, 在 pH 6.5–7.5 时, 产率较高, 其中, pH 7.0 时最高为 53.5%。

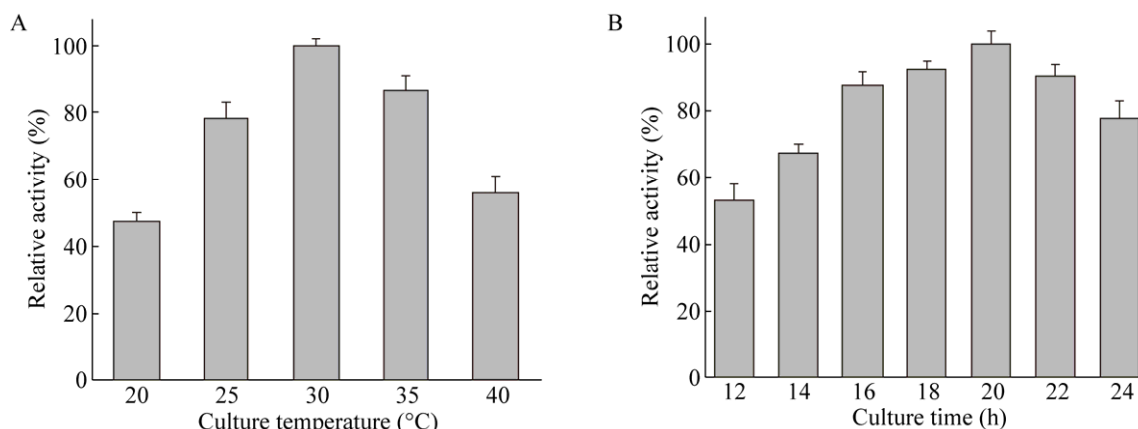


图 6 培养温度 (A) 及培养时间 (B) 对枯草芽孢杆菌中 SPase 表达的影响

Fig. 6 Influence of culture temperature (A) and time (B) on SPase expression in *Bacillus subtilis*.

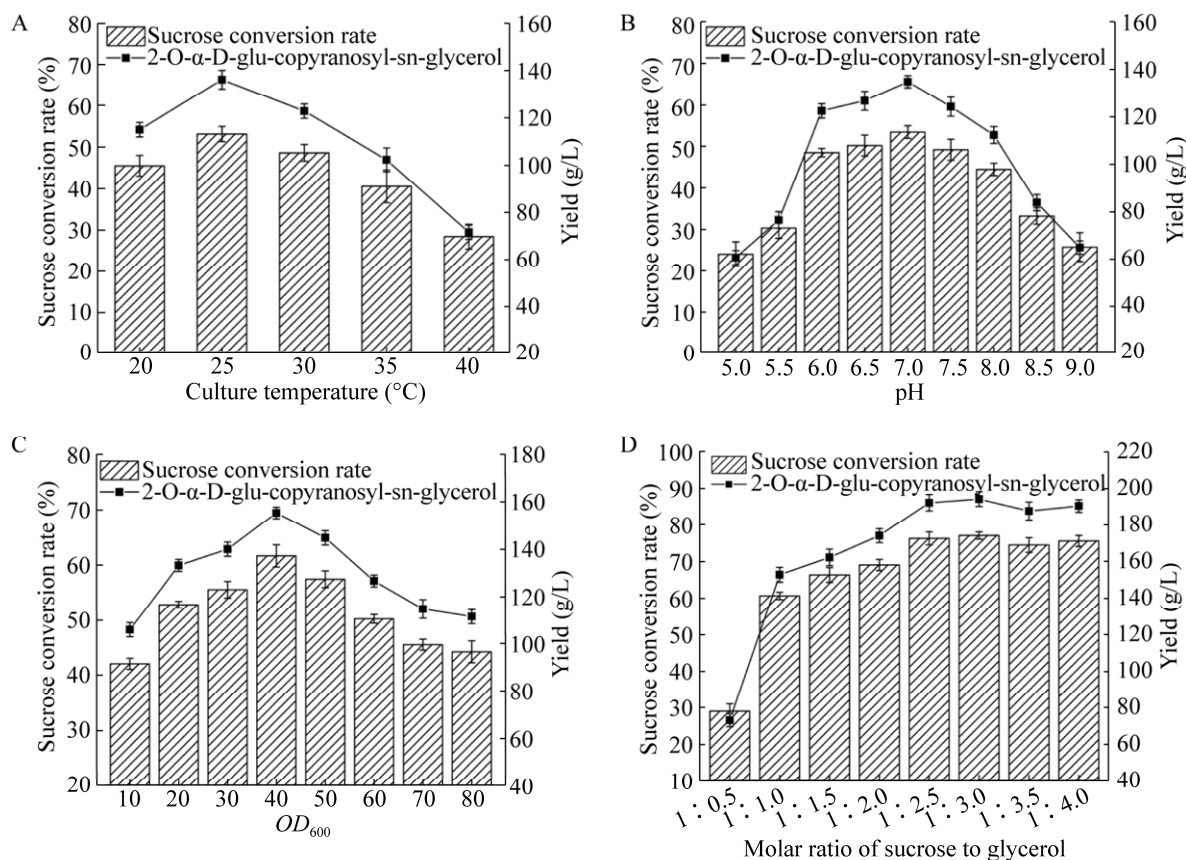


图7 温度 (A)、pH (B)、菌体密度 (C) 及底物浓度 (D) 对重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响

Fig. 7 Influence of temperature (A), pH (B), cell density (C) and substrate concentration (D) on the transformation of 2-O- α -D-glu-copyranosyl-sn-glycerol in recombinant *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* whole cells.

2.5.3 菌体量对全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响

在转化反应中将菌体浓度控制在适宜的水平, 对满足生产需要和降低生产成本是至关重要的。按方法 1.2.4 接种重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 转接发酵培养基, 30 °C 培养 20 h 后离心收集菌体, 进行全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷。控制反应温度为 30 °C, 初始 pH 7.0, 蔗糖浓度 1 mol/L, 甘油浓度 1 mol/L, 菌体 OD_{600} 分别为 10、20、30、40、50、60、70、80 的条件下进行全细胞转化反应。结果如图 7C 所示, 转化体系菌体 OD_{600} 为 40 时, 蔗糖转化率最高, 达到 61.7%, 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷产量为 156.5 g/L; 菌体量继续增加, 转

化率并没有随之提高, 可能是因为转化体系中, 小部分的蔗糖被菌体自身用于维持基本的生命活动所消耗。

2.5.4 底物浓度对全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的影响

当反应体系中没有磷酸盐的情况下, 蔗糖磷酸化酶催化蔗糖分解为果糖和葡萄糖基-酶中间体, 并以甘油为受体催化转糖基反应合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷。理论上, 蔗糖和甘油合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的摩尔比为 1 : 1, 但以甘油为受体的转糖基反应是一个可逆反应, 反应中使甘油过量, 可能会促使蔗糖得到较高的转化率。所以, 控制反应温度 30 °C, 初始 pH 7.0, 菌体 OD_{600} 为 40, 蔗糖浓

度 1 mol/L, 设置不同浓度蔗糖和甘油的摩尔配比的条件下进行全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 结果如图 7D 所示, 转化体系中的蔗糖和甘油的摩尔配比为 1:2.5 时, 蔗糖转化率达 76.3%, 继续增大甘油浓度, 转化率并没有随之提高。

2.6 5 L 发酵罐全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷

为验证重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 在大体系中的转化水平, 在实验室 5 L 发酵罐进行初步测试。用 1 L 50 mmol/L 的 MES 缓冲液悬浮 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 菌体, 控制反应温度 30 °C, 初始 pH 7.0, 蔗糖 1 mol/L, 甘油 2.5 mol/L, 菌体 OD_{600} 为 40 的条件下于 5 L 发酵罐上进行转化, HPLC 分析检测转化液中各组分含量。结果如图 8 所示, 前期的转化速率较快, 在 24 h 后反应逐渐减慢, 至 48 h 转化率基本达到最大, 共生成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷 189.3 g/L, 平均转化速率为 15.6 mmol/(L·h), 蔗糖转化率约为 75.1%。可以发现, 反应后期继续延长转化时间, 转化率变化不明显, 出现这种情况的原因, 一方面可能是由于反应趋于平衡, 另一方面可能是因为转化时间较长, 酶活力逐渐丧失。

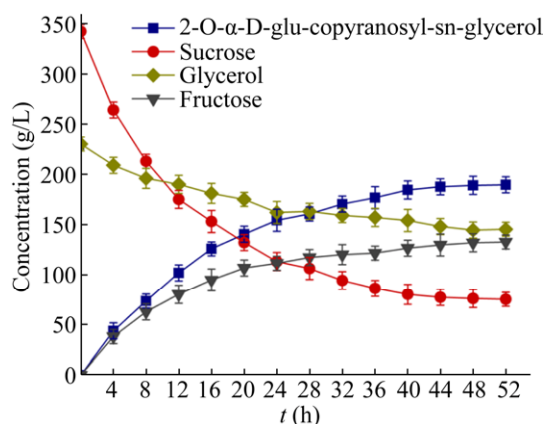


图 8 重组菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* 在 5 L 发酵罐全细胞转化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷

Fig. 8 The recombinant *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA* whole cells catalyze the synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-sn-glycerol in 5 L fermenter.

3 讨论

本研究将肠膜明串珠菌蔗糖磷酸化酶基因 *gtfA* 在大肠杆菌中进行克隆表达, 研究其酶学性质, 再将 *gtfA* 基因导入食品安全级枯草芽孢杆菌, 用来开发 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷合成的全细胞生物催化方法。成功构建重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 168/pMA5-*gtfA*, 通过优化培养条件, 实现了蔗糖磷酸化酶在重组枯草芽孢杆菌胞内的高效表达, 并将重组菌用作全细胞生物催化剂合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 利用优化后的全细胞转化条件, 在 30 °C、pH 7.0、菌体 OD_{600} 为 40、底物蔗糖浓度 1 mol/L、甘油浓度 2.5 mol/L 的条件下, 在 5 L 发酵罐进行全细胞转化 48 h 后, 生成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷 189.3 g/L, 平均转化速率为 15.6 mmol/(L·h), 蔗糖转化率约为 75.1%, 这是目前报道的利用重组枯草芽孢杆菌催化合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的最高产量。2-O- α -D-甘油葡萄糖苷是一种在食品、化妆品、保健品及医药领域有着重大应用前景的高附加值产品, 本研究首次利用枯草芽孢杆菌全细胞转化的方法应用于合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷, 与酶法合成相比, 全细胞催化发生在胞内, 反应更稳定, 可重复利用率高, 而且省去了酶法催化前期所需破碎细胞的过程, 工艺流程更简便, 经济效益更高; 另外, 将食品安全级菌株用作表达宿主, 也拓宽了产品在食品、医药领域的应用。然而, 在合成 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷上, 不管是酶法合成, 还是全细胞催化方法, 最终转化液中都有一定浓度的蔗糖和果糖存在, 虽然有研究报道过一种从转化液中分离纯化出 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的方法, 但也仅有 63% 的产品收率^[20]。所以, 仍需要通过改进下游分离纯化工艺^[26], 以进一步提高 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷收率。总之, 本研究所构建的重组枯草芽孢杆菌全细胞催化方法及其相关研究结果, 为 2-O- α -D-甘油葡萄糖苷的工业化生产及应用奠定了理论和实验基础。

REFERENCES

- [1] Goedl C, Sawangwan T, Wildberger P, et al. Sucrose phosphorylase: a powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals. *Biocatal Biotransformat*, 2010, 28(1): 10–21.
- [2] Klähn S, Hagemann M. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environ Microbiol*, 2011, 13(3): 551–562.
- [3] Bianchi G, Gamba A, Limiroli R, et al. The unusual sugar composition in leaves of the resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia*. *Physiol Plant*, 1993, 87(2): 223–226.
- [4] Takenaka F, Uchiyama H, Imamura T. Identification of α -D-glucosylglycerol in sake. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2): 378–385.
- [5] Hinch D, Hagemann M. Stabilization of model membranes during drying by compatible solutes involved in the stress tolerance of plants and microorganisms. *Biochem J*, 2004, 383(2): 277–283.
- [6] Borges N, Ramos A, Raven N, et al. Comparative study of the thermostabilizing properties of mannosylglycerate and other compatible solutes on model enzymes. *Extremophiles*, 2002, 6(3): 209–216.
- [7] Sawangwan T, Goedl C, Nidetzky B. Glucosylglycerol and glucosylglycerate as enzyme stabilizers. *Biotechnol J*, 2010, 5(2): 187–191.
- [8] Schrader A, Siefken W, Kueper T, et al. Effects of glyceryl glucoside on AQP3 expression, barrier function and hydration of human skin. *Skin Pharmacol Physiol*, 2012, 25(4): 192–199.
- [9] Harada N, Zhao J, Kurihara H, et al. Effects of topical application of α -D-glucosylglycerol on dermal levels of insulin-like growth factor-I in mice and on facial skin elasticity in humans. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(4): 759–765.
- [10] Takenaka F, Uchiyama H. Synthesis of α -D-glucosylglycerol by α -glucosidase and some of its characteristics. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(9): 1821–1826.
- [11] Takenaka F, Uchiyama H. Effects of α -D-glucosylglycerol on the *in vitro* digestion of disaccharides by rat intestinal enzymes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, 65(7): 1458–1463.
- [12] Dabhi AS, Bhatt NR, Shah MJ. Voglibose: An α glucosidase inhibitor. *J Clin Diagn Res*, 2013, 7(12): 3023–3027.
- [13] Sawangwan T. Glucosylglycerol on performance of prebiotic potential. *Funct Foods Health Dis*, 2015, 5(12): 427–436.
- [14] Luley C, Sawangwan T, Mueller M, et al. Biocatalytic process for production of α -glucosylglycerol using sucrose phosphorylase. *Food Technol Biotechnol*, 2010, 48(3): 276–283.
- [15] Tan XM, Luo Q, Lu XF. Biosynthesis, biotechnological production, and applications of glucosylglycerols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(14): 6131–6139.
- [16] Hagemann M. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiol Rev*, 2011, 35(1): 87–123.
- [17] Roder A, Hoffmann E, Hagemann M, et al. Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 243(1): 219–226.
- [18] Ma PZ, Tan XM, Lv XF, et al. Effects of *ggpS* over-expression on glycosylglycerol and glycerol biosynthesis of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Chin J Biotech*, 2016, 32(3): 347–354 (in Chinese).
马培珍, 谈晓明, 吕雪峰, 等. *ggpS* 基因过表达对集胞藻 PCC 6803 甘油葡萄糖苷和甘油合成的影响. *生物工程学报*, 2016, 32(3): 347–354.
- [19] Tan XM, Du W, Lu XF. Photosynthetic and extracellular production of glucosylglycerol by genetically engineered and gel-encapsulated cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(5): 2147–2154.
- [20] Goedl C, Sawangwan T, Mueller M, et al. A high-yielding biocatalytic process for the production of 2-O-(α -D-glucopyranosyl)-*sn*-glycerol, a natural osmolyte and useful moisturizing ingredient. *Angewand Chem Int Ed*, 2008, 47(52): 9558–9561.

- 10086–10089.
- [21] Zhao L, Tian RZ, Shen QY, et al. Pathway engineering of *Bacillus subtilis* for enhanced N-acetylneuraminic acid production via whole-cell biocatalysis. *Biotechnol J*, 2019, 14(7): 1800682.
- [22] Moon S, Kong B, Jung YH, et al. Endotoxin-free purification of recombinant membrane scaffold protein expressed in *Escherichia coli*. *Proc Biochem*, 2018, 66: 230–236.
- [23] Bolevar JM, Luley-Goedl C, Leitner E, et al. Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format. *J Biotechnol*, 2017, 257: 131–138.
- [24] Hou GW, Ma JF, Sui SS, et al. Research progress on production and application of sucrose phosphorylase. *China Brew*, 2010, 29(6): 17–20 (in Chinese).
- 侯顾伟, 马江锋, 隋姗姗, 等. 蔗糖磷酸化酶制备及应用的研究进展. *中国酿造*, 2010, 29(6): 17–20.
- [25] Li X, Xu SQ, Zhang X, et al. Design of a high-efficiency synthetic system for L-asparaginase production in *Bacillus subtilis*. *Eng Life Sci*, 2019, 19(3): 229–239.
- [26] Liu XY, Lv XF, Tan XM. Study on the absorption separation of glucosylglycerol. *J Qingdao Agric Univ: Nat Sci*, 2015, 32(4): 289–293 (in Chinese).
- 刘欣昱, 吕雪峰, 谈晓明. 甘油葡萄糖苷的吸附分离方法研究. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2015, 32(4): 289–293.

(本文责编 郝丽芳)