

长双歧杆菌蔗糖磷酸化酶的异源表达及其酶学性质

项蓉¹, 杨金山¹, 姜婷婷^{2,3}, 吴子健¹, 张宏宇^{1*}, 赵彦巧¹, 王丹芸¹, 张得光¹, 马兴³

(1.天津商业大学 生物技术与食品科学学院 天津市食品生物技术重点实验室, 天津 300134; 2.天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457; 3.天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: 为挖掘来源于长双歧杆菌的蔗糖磷酸化酶(*Bifidobacterium longum* sucrose phosphorylase, BloSPase)合成 2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA-2G)的潜力, 该研究将 BloSPase 基因在大肠杆菌中异源表达, 以 BloSPase 的水解酶活力为指标, 通过单因素试验和响应面法对其表达条件进行优化; 并通过镍柱纯化后对其转糖基化活力进行研究。结果表明, BloSPase 的最佳表达条件为诱导时间 10 h、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)浓度 0.47 mmol/L、诱导温度 23 $^{\circ}$ C。在该条件下, 水解酶活力可达到 (730.35 $\pm$ 0.58) U/mL, 比酶活达到 (95.22 $\pm$ 2.45) U/mg。酶学性质研究显示, BloSPase 转糖基化活力的最适反应温度为 50 $^{\circ}$ C, 最适反应 pH 值为 5.2, 在 40、50 $^{\circ}$ C 时表现出较强的热稳定性。其动力学参数 K_m 值为 (266.80 $\pm$ 23.76) mmol/L, V_{max} 值为 (0.235 0 $\pm$ 0.009 9) mmol/(L $\cdot$ min)。

关键词: 蔗糖磷酸化酶; 大肠杆菌; 异源表达; 转糖基化活力; 酶学性质

Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium longum*

XIANG Rong¹, YANG Jinshan¹, LOU Tingting^{2,3}, WU Zijian¹, ZHANG Hongyu^{1*}, ZHAO Yanqiao¹,
WANG Danyun¹, ZHANG Deguang¹, MA Xing³

(1. Tianjin Key Laboratory of Food Biotechnology, College of Biotechnology and Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China; 2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 3. Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center of Tianjin Customs, Tianjin 300461, China)

Abstract: To explore the potential of *Bifidobacterium longum* sucrose phosphorylase (BloSPase) to synthesize 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), BloSPase gene was heterogeneously expression in *Escherichia coli* in this study. Using the hydrolytic enzyme activity of BloSPase as the indicator, the expression conditions were optimized by single-factor experiments and response surface method. The activity of transglycosylation was studied after purification by nickel column. The optimal expression conditions of BloSPase were as follows: induction time of 10 h, final concentration of isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) of 0.47 mmol/L, induction temperature of 23 $^{\circ}$ C. Under these conditions, the hydrolytic enzyme activity and specific activity of BloSPase reached (730.35 $\pm$ 0.58) U/mL and (95.22 $\pm$ 2.45) U/mg, respectively. Enzymatic property studies showed that the optimum reaction temperature and optimal reaction pH value of BloSPase transglycosylation activity were 50 $^{\circ}$ C and pH5.2 respectively, and the enzyme showed strong thermal stability at 40 $^{\circ}$ C and 50 $^{\circ}$ C. The kinetic parameters K_m and V_{max} were (266.80 $\pm$ 23.76) mmol/L and (0.235 0 $\pm$ 0.009 9) mmol/(L $\cdot$ min) respectively.

Key words: sucrose phosphorylase; *Escherichia coli*; heterologous expression; transglycosylation activity; enzymatic properties

基金项目: 国家重点研发计划课题(2022YFF1100801); 2022 年天津市研究生科研创新项目(服务产业专项)(2022SKYZ081); 天津市科技计划项目(20YFZCSN00630); 天津市大学生创新创业训练计划项目(202310069097)

作者简介: 项蓉(1997—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品酶资源的挖掘及应用。

*通信作者: 张宏宇(1984—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 食品酶资源的挖掘及应用。

引文格式:

项蓉,杨金山,姜婷婷,等.长双歧杆菌蔗糖磷酸化酶的异源表达及其酶学性质[J].食品研究与开发,2024,45(5):196-204.

XIANG Rong, YANG Jinshan, LOU Tingting, et al. Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium longum*[J]. Food Research and Development, 2024, 45(5): 196-204.

蔗糖磷酸化酶是一种碳水化合物活性酶,属于糖苷水解酶 GH13 家族^[1-2],能够催化蔗糖和磷酸盐可逆转化,生成 α -D-吡喃葡萄糖磷酸和D-果糖。在反应过程中遵循双重置换机制,并能够与绝大多数糖基受体发生磷酸化、转糖基化和水解三种类型的反应^[3-4]。作为一种高效的转糖基化酶,蔗糖磷酸化酶因其广泛的底物专一性,在食品、化妆品、医药等领域极具应用潜力^[5-7]。其主要有3个方面的应用,分别为1)功能低聚糖的制备:蔗糖磷酸化酶可以以某些单糖或糖醇类作为受体,催化合成相应的多一个葡萄糖基团的低聚糖,例如将葡萄糖和蔗糖为底物转化生成益生元曲二糖^[8];2)糖苷类化合物的制备:蔗糖磷酸化酶还可以作用于含醇羟基、酚羟基及羧基的化合物,如催化对苯二酚合成具有美白功效的 α -熊果苷^[9],催化甘油合成保湿剂 α -D-葡萄糖甘油^[10],以及催化抗坏血酸合成稳定性高且水溶性好的抗氧化剂2-O- α -D-吡喃葡萄糖基-L-抗坏血酸(2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, AA-2G)^[11]等;3)植物多酚类化合物制备:蔗糖磷酸化酶可以作用于某些植物多酚提高其稳定性和水溶性,例如蔗糖磷酸化酶可催化白藜芦醇生成白藜芦醇3- α -葡萄糖苷^[12-13],以及催化儿茶素生成儿茶素-3-O-D-葡萄糖苷^[14-15]等。

蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, SPase)主要来源于微生物,但其在野生型菌株中的合成途径复杂,酶产量较低,难以满足工业需求^[9]。近年来,已通过异源表达实现了不同来源的蔗糖磷酸化酶的高效表达。例如来源于青春双歧杆菌^[16](*Bifidobacterium adolescentis*)、短双歧杆菌^[11](*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌^[17](*Bifidobacterium longum*)、肠膜明串珠菌^[18](*Leuconostoc mesenteroides*)、罗伊氏乳杆菌^[19](*Lactobacillus reuteri*)、嗜热杆菌^[20](*Thermobacillus* sp.)和变异链球菌^[21](*Streptococcus mutans*)等的蔗糖磷酸化酶已在大肠杆菌中实现了高效的异源表达。其中,Kwon等^[22]成功构建了来源于长双歧杆菌的蔗糖磷酸化酶(*Bifidobacterium longum* sucrose phosphorylase, BloSPase)的重组菌株并表达了蔗糖磷酸化酶,首次利用蔗糖磷酸化酶合成了AA-2G。Gudiminchi等^[17]也利用异源表达的BloSPase成功合成了AA-2G,并且发现该酶表现出特殊的pH依赖性优势,在pH值为5.2时,具有较高的效率和较好的位点选择性,且杂质AA-6G的产量较少。Zhou等^[11]比较了8个不同来源的蔗糖磷酸化酶合成AA-2G时的转糖基化活力,其中BloSPase表现出了较高的转糖基化活力。

因此,BloSPase在合成AA-2G方面极具应用潜力。

本研究选择pET-28a和大肠杆菌BL21(DE3)作为表达载体和表达宿主,对BloSPase进行异源表达,为提高其可溶性表达的产量,考察诱导时间、诱导温度和异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG)浓度对BloSPase表达的影响,确定BloSPase的最佳表达条件;采用镍离子柱亲和层析纯化BloSPase,并对BloSPase的转糖基化活力及其酶学参数进行表征,以期BloSPase的进一步应用及分子改造提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌BL21(DE3)由天津商业大学生物技术与食品科学学院实验室保存。LB培养基(固体培养基添加2%琼脂粉)、琼脂粉、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)试剂:北京索莱宝科技有限公司;蛋白分子量Marker:上海百赛生物技术股份有限公司;蛋白上样缓冲液、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)缓冲液、Ni-NTA亲和层析填料:金斯瑞生物科技股份有限公司;质粒小提试剂盒、卡那霉素、咪唑、磷酸盐缓冲液、高效感受态细胞制备试剂盒、改良型二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、IPTG、DNA Marker(300~2 500 bp):生工生物工程(上海)股份有限公司;超滤管(截留10 kDa):美国Millipore公司。以上化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PCR仪(Mastecycler nexus gradient)、高速冷冻离心机(Centrifuge 5430):德国Eppendorf公司;微量分光光度计(NanoPhotometer® N60):德国Implen GmbH公司;超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-IIID型):宁波新芝生物科技股份有限公司;恒温培养箱(SPX-100B-D):上海博迅实业有限公司医疗设备厂;恒温摇床(ZQTY-70):上海知楚仪器有限公司;蛋白电泳仪(PowerPac Universal):美国BIO-RAD公司;高效液相色谱仪(EClassical 3100):大连依利特分析仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 重组质粒pET-28a/BloSPase的构建

在NCBI数据库中查找到BloSPase的基因序列(GenBank编号:AA084039),按照大肠杆菌的密码子

偏好性进行优化,并将 *Nde* I 和 *Bam*HI 两个酶切位点分别加到序列的 5'端和 3'端,选择 pET-28a 为载体,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成得到含 BloSPase 基因的重组质粒 pET-28a/BloSPase。将合成得到的重组质粒转化进入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,并涂布于 LB 固体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素),挑取单菌落转接到 LB 液体培养基(50 μ g/mL 卡那霉素)中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床培养,设计扩增 BloSPase 基因的引物(上游引物 F:5'-GGCAGCC-ATATGAAAAACAAAGTTCAG-3',下游引物 R:5'-CGG-AGCTCGAATTCGGATCCTTAAT-3'),通过菌液聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)验证阳性后提取质粒进行测序验证。

1.3.2 重组菌的诱导表达

将重组菌的单菌落接种到 LB 液体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素)中,于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床培养,将过夜培养物按 1% 接种量转接至 50 mL 的 LB 液体培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素)中,于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温摇床培养,直至 OD₆₀₀ 值约 0.6 时,加入 IPTG 诱导蛋白表达,于恒温摇床孵育。将菌液离心收集细胞(10 000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C,10 min),再重悬浮于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)中,于冰上超声破碎细胞(95 W,超声 2.5 s,间歇 3 s,总共 10 min)。将裂解液离心(10 000 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C,10 min),保留上清液,即为粗酶液。

1.3.3 重组 BloSPase 诱导表达条件的优化

1.3.3.1 单因素试验

通过单因素试验优化 BloSPase 的表达条件,以 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度为变量,以粗酶液水解蔗糖的酶活力为指标评价 BloSPase 表达量。加入浓度分别为 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L 的 IPTG,24 $^{\circ}$ C 诱导 8 h,考察 IPTG 浓度对 BloSPase 表达量的影响;加入浓度为 0.50 mmol/L 的 IPTG,分别于 16、20、24、28、32 $^{\circ}$ C,诱导 8 h,考察诱导温度对 BloSPase 表达量的影响;加入浓度为 0.50 mmol/L 的 IPTG,于 24 $^{\circ}$ C 下,分别诱导 6、8、10、12、18、24 h,考察诱导时间对 BloSPase 表达量的影响。每个试验重复 3 次取平均值。

1.3.3.2 响应面试验

在单因素试验的基础上,使用 Design Expert 8.0.6.1 软件,设计以诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度为变量,以 BloSPase 的水解酶活力为响应值的三因素三水平响应面试验,确定重组 BloSPase 表达的最佳条件。试验设计编码见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平编码

Table 1 Factors and levels for response surface experiment

水平	因素		
	A 诱导温度/ $^{\circ}$ C	B 诱导时间/h	C IPTG 浓度/(mmol/L)
-1	20	6	0.25
0	24	8	0.50
1	28	10	0.75

1.3.4 重组 BloSPase 的纯化

使用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤粗酶液后将其与结合缓冲液(300 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 磷酸二氢钠,20 mmol/L 咪唑,pH7.4)按体积比 1:1 混合均匀。用结合缓冲液以 1 mL/min 的流速平衡镍柱后,再将混合液上样到镍柱中,以 0.5 mL/min 流速流穿。待样品与镍柱结合孵育 1 h 后,用洗涤缓冲液(300 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 磷酸二氢钠,100 mmol/L 咪唑,pH7.4)洗去杂蛋白,再用洗脱缓冲液(300 mmol/L 氯化钠,50 mmol/L 磷酸二氢钠,250 mmol/L 咪唑,pH7.4)洗脱并收集目的蛋白。收集到的蛋白洗脱液于去离子水中进行透析后,再用超滤管进行离心(4 500 $\times$ g,4 $^{\circ}$ C,30 min)浓缩得到纯蛋白,并通过 SDS-PAGE 分析检测。

1.3.5 重组 BloSPase 的蛋白含量及水解酶活力测定

BloSPase 的蛋白浓度测定采用二喹啉甲酸法,使用改良型 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,在波长 562 nm 下测定吸光值计算蛋白浓度。以牛血清蛋白为标准蛋白,并且以其蛋白浓度为横坐标(x),紫外吸光系数为纵坐标(y),在 562 nm 波长下测得标准曲线为 $y = 0.0004x - 0.0068$ ($R^2=0.9997$)。

BloSPase 水解酶活力的测定采用 DNS 还原糖测定法^[23-24]。反应体系包括 5% 蔗糖溶液 250 μ L,50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.4)225 μ L,稀释适当倍数的酶液 25 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 后,立即加入 375 μ L DNS 试剂沸水浴 10 min,冷却至室温后测定 540 nm 下的吸光值。配制不同浓度的果糖溶液,同样条件下与 DNS 试剂反应,绘制标准曲线为 $y = 0.7933x - 0.0599$ ($R^2=0.9999$)。蔗糖磷酸化酶的一个酶活力单位(U)定义为每分钟水解蔗糖生成 1 mmol 的果糖所需的酶量。

1.3.6 重组 BloSPase 的转糖基化活力的测定

BloSPase 的转糖基化活力测定参考文献[11]的方法并稍作修改,反应体系设为 500 μ L,其中含有 1.2 mol/L 的 L-抗坏血酸、0.8 mol/L 蔗糖、100 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液和 250 μ g/mL 纯化酶,于 40 $^{\circ}$ C 孵育 72 h,反应结束后将反应混合物取出加入 0.05 mol/L 的盐酸溶液终止反应。采用配有紫外检测器的高效液相色谱仪和 COSMOSIL PBr 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μ m),以 1% 甲醇(磷酸调至 pH2.5)为流动相,并设置流动相流速为 0.8 mL/min,在检测波长 238 nm 下,对 L-抗坏血酸及 AA-2G 进行检测。

一个单位(U)的转糖基化活力是指在给定条件下每分钟形成 1 μ mol 的 AA-2G 的酶的量。

1.3.6.1 pH 值对重组 BloSPase 转糖基活力和稳定性的影响

按照 1.3.6 的方法,在不同 pH 值(4.0~7.0)的 100 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液中,测定 BloSPase 转糖基化活力的最适 pH 值。将纯化酶置于不同 pH 值的

100 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(4.0~7.0)中于 4℃保存 12 h 后,测定其残余酶活力,考察 BloSPase 的 pH 值稳定性。以最高的转糖基化活力为 100%,计算相对酶活力。上述每个试验重复 3 次。

1.3.6.2 温度对重组 BloSPase 转糖基活力和稳定性的影响

在最适 pH 值下,将纯化酶置于不同温度(30~65℃)下反应,测定 BloSPase 的转糖基化活力的最适温度。将纯化酶分别在 40、50、60℃下孵育 0、12、24、36、48、60、72 h 后,测定其残余酶活力,考察 BloSPase 的热稳定性。以最高的转糖基化活力为 100%,计算相对酶活力。上述每个试验重复 3 次。

1.3.6.3 重组 BloSPase 的酶促反应动力学测定

在 40℃和最适 pH 值条件下,测定以不同浓度(50~500 mmol/L)的 L-抗坏血酸为底物时的酶活力。根据 AA-2G 产物的量评估最初 1 h 的反应速度。使用 Origin 2021 软件通过米氏方程对不同 L-抗坏血酸浓度下的初始速率进行非线性拟合,计算动力学参数(K_m 和 V_{max})。上述每个试验重复 3 次。

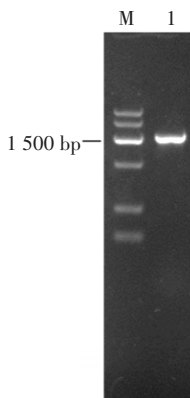
1.4 数据处理

每组试验重复 3 次求平均值,使用 Microsoft Excel 2019 软件、Origin 2021 软件对单因素试验结果进行分析和制图,并使用 Design Expert 8.0.6.1 软件设计响应面试验和分析试验数据。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET-28a/BloSPase 的表达

将重组质粒 pET-28a/BloSPase 转化进入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,以重组菌的单克隆菌液为模板,进行菌液 PCR 扩增验证,扩增产物见图 1。



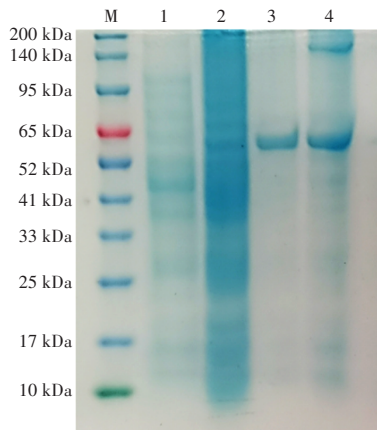
M 为 Marker;1 为菌液 PCR 产物。

图 1 重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase 菌液 PCR 鉴定结果

Fig. 1 Results of PCR identification of recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase

由图 1 可知,扩增产物大小约为 1 500 bp,与目的

基因大小一致。并且质粒测序结果显示序列正确,表明重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase 构建成功。对重组菌诱导表达后,通过超声破碎后离心取上清液,通过 SDS-PAGE 电泳分析 BloSPase 表达情况,结果见图 2。



M. Marker;1. 导入空质粒 pET-28a 的大肠杆菌 BL21(DE3)破壁上清液;2. 未诱导的大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase 破壁上清液;3. 纯化后的重组 BloSPase;4. 大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase 诱导表达的 BloSPase 粗酶液。

图 2 重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase 表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-28a/BloSPase expression

由图 2 可知,重组菌菌液加入 IPTG 诱导后,在约 56 kDa 出现了明显的目的条带,与目的蛋白质分子大小一致,表明了 BloSPase 能够在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达。而重组菌未诱导表达时,在约 56 kDa 处有浅显的目的条带,可能是因为在 T7 强启动子下重组菌也会表达微量目的蛋白。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 IPTG 浓度对重组 BloSPase 表达的影响

按 1.3.2 方法接种得到菌液,在 OD 值约 0.6 时,分别添加浓度为 0.10、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L 的 IPTG,在 24℃下,诱导 8 h 后,将菌液超声破碎后离心取上清液,对其水解酶活力进行测定,结果见图 3。

由图 3 可知,当 IPTG 浓度在 0.10~0.50 mmol/L 时水解酶活力逐渐增加,在 IPTG 浓度为 0.50 mmol/L 时水解酶活力达到最大,当 IPTG 浓度大于 0.50 mmol/L 后水解酶活力开始下降。这主要是因为 IPTG 浓度会影响蛋白的表达速率、溶解度及活性,而过高浓度不利于蛋白的表达和细胞活性,会导致蛋白质在表达过程中形成包涵体并抑制大肠杆菌的生长。但加入适量的 IPTG,则能降低大肠杆菌细胞的代谢负荷,提高表达水平^[25-27]。因此,IPTG 浓度选择 0.50 mmol/L 左右进行后续响应面优化试验。

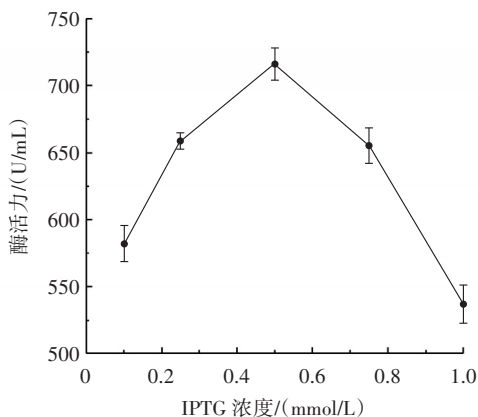


图3 IPTG 浓度对重组 BloSPase 表达的影响

Fig.3 Effect of IPTG concentration on the expression of recombinant BloSPase

2.2.2 诱导温度对重组 BloSPase 表达的影响

为探究不同诱导温度对重组 BloSPase 表达的影响,将菌液分别于 16、20、24、28、32 °C 下诱导,制备粗酶液,对其水解酶活力进行测定,结果见图 4。

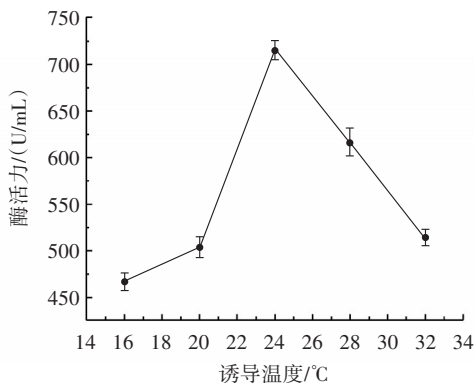


图4 诱导温度对重组 BloSPase 表达的影响

Fig.4 Effect of induction temperature on the expression of recombinant BloSPase

由图 4 可知,当诱导温度为 24 °C 时,BloSPase 的水解酶活力最高;当温度小于或大于 24 °C 时,水解酶活力均较低。因为诱导温度不仅影响细菌的生长,还影响重组蛋白的表达和蛋白的溶解性^[28]。一般来说,细菌细胞在低温下生长缓慢,低温使细胞内代谢酶的活性降低,导致重组蛋白质的合成速度降低。在更高的温度下,蛋白质的合成可以加速,但过高的温度可能会阻止酶蛋白质的正确折叠,从而使蛋白质没有达到足够的溶解度,导致形成不活跃的包涵体^[29]。因此,诱导温度选择 24 °C 左右进行后续的响应面优化试验。

2.2.3 诱导时间对重组 BloSPase 表达的影响

为探究诱导时间对重组 BloSPase 表达的影响,将菌液分别诱导 6、8、10、12、18、24 h,制备粗酶液,对其水解酶活力进行测定,结果见图 5。

由图 5 可知,当诱导时间在 6~8 h 内,水解酶活力

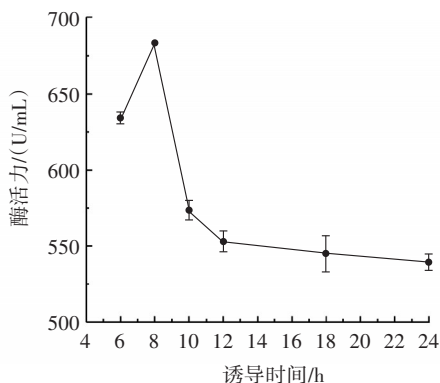


图5 诱导时间对重组 BloSPase 表达的影响

Fig.5 Effect of induction time on the expression of recombinant BloSPase

呈升高趋势,在 8 h 时水解酶活力达到峰值。随着诱导时间的延长,水解酶活力逐渐降低,可能是由于环境发生变化以及培养基中营养物质的限制,目的蛋白在表达的同时被大量降解,同时诱导时间过长也会对细胞活性产生消极影响,出现菌体老化从而使表达量降低^[30-31]。因此,诱导时间选择 8 h 左右进行后续的响应面优化试验。

2.3 响应面试验结果

2.3.1 响应面试验设计及结果

单因素试验显示重组 BloSPase 的最佳诱导条件为诱导时间 8 h、IPTG 浓度 0.5 mmol/L、诱导温度 24 °C,在此基础上确定响应面试验的因素水平进行优化。以诱导温度(A)、诱导时间(B)、IPTG 浓度(C)为自变量,BloSPase 的水解酶活力为响应值,响应面试验设计见表 2。

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Design and results of the response surface experiment

试验号	因素			酶活力/(U/mL)
	A 诱导温度	B 诱导时间	C IPTG 浓度	
1	-1	-1	0	375.43
2	1	-1	0	512.21
3	-1	1	0	696.06
4	1	1	0	613.03
5	-1	0	-1	494.31
6	1	0	-1	534.38
7	-1	0	1	546.48
8	1	0	1	615.39
9	0	-1	-1	430.84
10	0	1	-1	690.01
11	0	-1	1	521.15
12	0	1	1	630.85
13	0	0	0	723.51
14	0	0	0	701.49
15	0	0	0	686.87
16	0	0	0	672.92
17	0	0	0	678.30

2.3.2 响应面回归模型的构建与方差分析

使用 Design Expert 8.0.6.1 软件对表 2 结果进行分析,建立二次多项回归方程: $Y=692.62+20.34A+98.79B+20.54C-54.95AB+7.21AC-37.37BC-82.00A^2-61.43B^2-62.98C^2$,并对回归模型进行方差分析,结果见表 3。

表 3 回归模型方差分析
Table 3 Analysis of variance of the regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	170 515.80	9	18 946.20	35.97	<0.000 1	**
A	3 310.11	1	3 310.11	6.28	0.040 6	*
B	78 077.16	1	78 077.16	148.23	<0.000 1	**
C	3 375.04	1	3 375.04	6.41	0.039 2	*
AB	12 079.76	1	12 079.76	22.93	0.002 0	**
AC	208.08	1	208.08	0.40	0.549 6	
BC	5 585.21	1	5 585.21	10.60	0.013 9	*
A ²	28 313.96	1	28 313.96	53.75	0.000 2	**
B ²	15 888.54	1	15 888.54	30.16	0.000 9	**
C ²	16 698.50	1	16 698.50	31.70	0.000 8	**
残差	3 687.11	7	526.73			
失拟项	2 027.91	3	675.98	1.63	0.316 8	
纯误差	1 659.20	4	414.80			
总和	174 202.90	16				

注: *表示影响显著($P<0.05$); **表示影响极显著($P<0.01$)。
由表 3 可知,该模型的失拟项 $P=0.316\ 8>0.05$,模

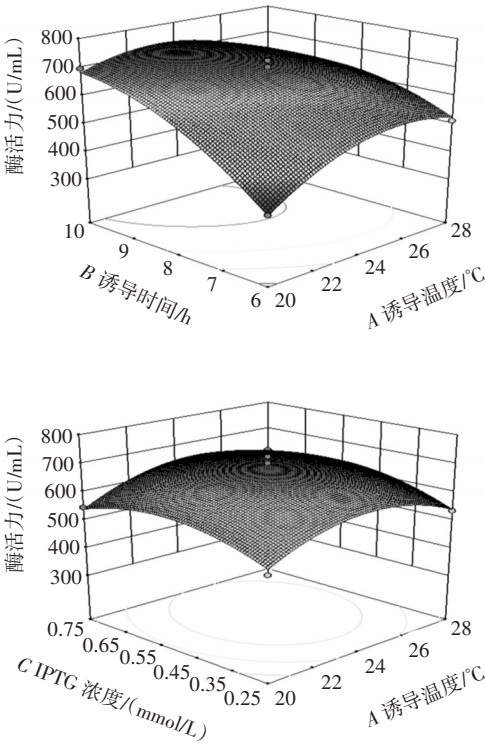
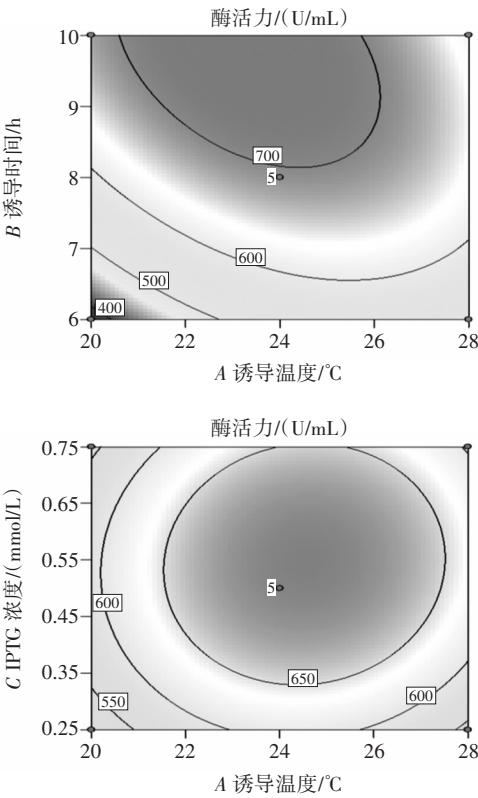
型 $P<0.000\ 1$,表明该模型与实际试验的拟合程度好;回归模型的决定系数 $R^2=0.978\ 8$,校正决定系数 $R^2_{Adj}=0.951\ 6$,说明模型拟合程度好,误差小,可用于预测 BloSPase 酶活力。 B 、 AB 对结果影响极显著($P<0.01$), A 、 C 、 BC 对结果影响显著($P<0.05$),二次项 A^2 、 B^2 和 C^2 对结果影响极显著($P<0.01$)。通过 F 值大小判断 3 个因素对 BloSPase 酶活力的影响的大小为 B (诱导时间) $>C$ (IPTG 浓度) $>A$ (诱导温度)。

通过 Design Expert 8.0.6.1 绘制出各因素之间交互作用的响应曲面和等高线见图 6。

由图 6 可知,诱导温度与诱导时间的相互作用的等高线呈椭圆形,且响应面曲面坡度陡峭,说明诱导温度和诱导时间交互作用对 BloSPase 水解酶活力的影响极显著($P<0.01$);诱导温度和 IPTG 浓度相互作用等高线呈圆形,且响应面曲面坡度不陡峭,则两者之间的相互作用不显著($P>0.05$);诱导时间和 IPTG 浓度相互作用的等高线呈椭圆形,且响应面曲面坡度相对陡峭,表明诱导时间和 IPTG 浓度之间的交互作用显著($P<0.05$)。这与方差分析结果一致。

2.3.3 验证试验结果

通过 Design Expert 8.0.6.1 软件建立的回归模型,预测的最佳诱导条件是诱导时间为 9.86 h、IPTG 浓度为 0.47 mmol/L、诱导温度为 23.23 ℃,此条件下 BloSPase 的水解酶活力可以达到 735.213 U/mL。结合实际情况,诱导条件设为 IPTG 浓度 0.47 mmol/L、诱导温度 23 ℃、诱导时间 10 h。在此条件下进行验证,水解酶



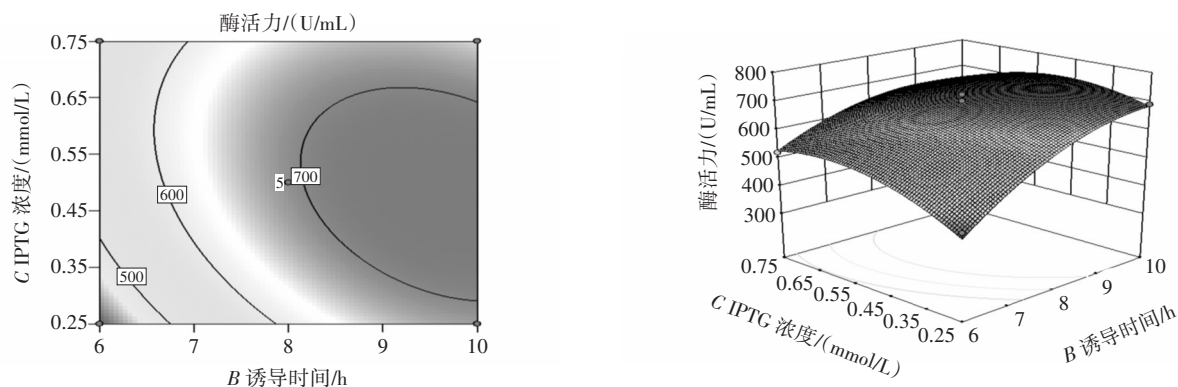


图6 各因素相互作用的响应曲面及等高线

Fig.6 Response surfaces and contour lines of the interaction of various factors

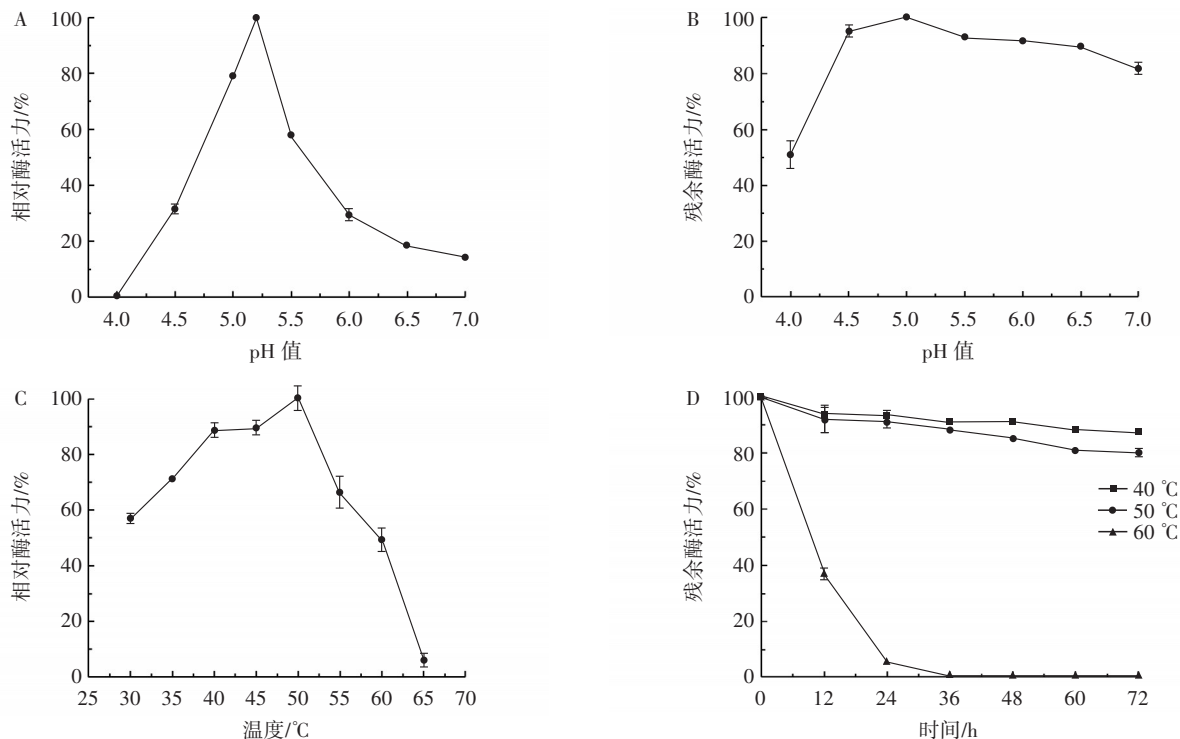
活力达到 (730.35 ± 0.58) U/mL,与模型预测值较接近,拟合性较好,验证了该模型的有效性。Zhang 等^[30]也对来源于长双歧杆菌 JCM1217 的蔗糖磷酸化酶的表达条件进行优化,但所得到的最佳表达条件与该试验优化的最佳表达条件不同,可能因为蔗糖磷酸化酶基因来源于不同菌株,且表达载体不同,从而导致其所需

的表达条件不同。并且将粗酶液用镍柱纯化后比酶活达到 (95.22 ± 2.45) U/mg。

2.4 重组 BloSPase 的转糖基化化学性质分析

pH 值和温度对酶的转糖基化活力和稳定性的影响见图 7。

由图 7A 可知, BloSPase 的最适 pH 值为 5.2,与



A. 最适 pH 值; B. pH 稳定性; C. 最适温度; D. 温度稳定性。

图7 pH 值和温度对重组 BloSPase 转糖基化活力及稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH and temperature on transglycosylation activity and stability of recombinant BloSPase

Gudiminchi 等^[17]所报道的一致, BloSPase 的糖基化活力具有严格的 pH 依赖性,只在很窄的 pH 范围内起作用;当 pH 值为 4 时, BloSPase 的糖基化活力几乎检测不到;此外,当 $pH > 5.2$ 时,转糖基化活力迅速下降。如图 7B 所示, BloSPase 在 pH 4.5~7.0 的柠檬酸钠缓冲液

中 4 °C 保存 24 h 后,残余酶活力在 80% 以上,说明在此范围内 BloSPase 的酸碱稳定性较好。如图 7C 所示,转糖基化反应的最适温度为 50 °C,但当孵育温度高于 50 °C 时,其活性迅速下降;在 30~60 °C 范围内反应,能保持约 50% 以上的酶活力;当温度上升至 65 °C

时,只残余约8%的酶活力。如图7D所示,BloSPase在40℃和50℃下孵育72h后,其残余酶活力仍保持在80%以上,证明BloSPase的热稳定性表现优异。

2.5 重组BloSPase的 K_m 和 V_{max}

测定重组BloSPase以不同浓度L-抗坏血酸为底物的转糖基化活力,得到BloSPase动力学参数 K_m 为(266.80±23.76) mmol/L, V_{max} 为(0.235 0±0.009 9) mmol/(L·min)。与来源于短双歧杆菌^[11]的蔗糖磷酸酶的 K_m (388.0±24.2) mmol/L相比,本研究中的BloSPase的 K_m 值相对更低,表明该酶与底物L-抗坏血酸的亲和力更大。

3 结论

本研究成功构建了BloSPase的重组表达菌,实现了BloSPase在大肠杆菌中的异源表达。通过单因素及响应面法优化了重组BloSPase的表达条件,在最优的诱导条件(IPTG浓度0.47 mmol/L、诱导温度23℃、诱导时间10h)下,重组BloSPase的水解酶活力达到(730.35±0.58) U/mL,通过镍离子亲和层析柱纯化后,BloSPase的水解比酶活达到(95.22±2.45) U/mg。BloSPase的转糖基化活力研究表明,最适反应温度为50℃,且在40℃和50℃下,该酶的相对酶活力仍保持80%以上,该酶具有良好的热稳定性;最适pH值为5.2,并且在pH值为4.5~7.0时,相对酶活力仍保持80%以上,酶具有较好的pH值稳定性。以抗坏血酸作为反应底物时,BloSPase的动力学反应参数 K_m 值为(266.80±23.76) mmol/L, V_{max} 值为(0.235 0±0.009 9) mmol/(L·min)。本研究通过对来源于长双歧杆菌的BloSPase的异源表达条件的优化及其转糖基化相关的酶学性质的测定,为其后续的转糖基化应用以及基于蛋白质工程的改造提供了重要的参考价值。

参考文献:

- [1] FRANCEUS J, DESMET T. Sucrose phosphorylase and related enzymes in glycoside hydrolase family 13: Discovery, application and engineering[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(7): 2526.
- [2] 江瑞妮, 叶康, 甘恬, 等. 蔗糖磷酸化酶及其在糖基化反应中的应用[J]. 生物工程学报, 2021, 37(1): 112-129.
JIANG Ruini, YE Kang, GAN Tian, et al. Application of sucrose phosphorylase in glycosylation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(1): 112-129.
- [3] ZHOU Y Y, GAN T, JIANG R N, et al. Whole-cell catalytic synthesis of 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid by sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium breve* via a batch-feeding strategy[J]. Process Biochemistry, 2022, 112: 27-34.
- [4] GOEDL C, SAWANGWAN T, WILDBERGER P, et al. Sucrose phosphorylase: A powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2010, 28(1): 10-21.
- [5] CERDOBBEL A, DE WINTER K, DESMET T, et al. Sucrose phosphorylase as cross-linked enzyme aggregate: Improved thermal stability for industrial applications[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(11): 1192-1197.
- [6] 杨林莉, 夏媛媛, 陈献忠. 蔗糖磷酸化酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4904-4917.
YANG Linli, XIA Yuanyuan, CHEN Xianzhong. Research progress on sucrose phosphorylase[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4904-4917.
- [7] XIA Y Y, LI X Y, YANG L L, et al. Development of thermostable sucrose phosphorylase by semi-rational design for efficient biosynthesis of α -D-glucosylglycerol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(19): 7309-7319.
- [8] WANG M M, WU J, WU D. Cloning and expression of the sucrose phosphorylase gene in *Bacillus subtilis* and synthesis of kojibiose using the recombinant enzyme[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 23.
- [9] YAO D, FAN J, HAN R Z, et al. Enhancing soluble expression of sucrose phosphorylase in *Escherichia coli* by molecular chaperones[J]. Protein Expression and Purification, 2020, 169: 105571.
- [10] XU H C, WEI B, LIU X J, et al. Robust enhancing stability and fructose tolerance of sucrose phosphorylase by immobilization on Ni-NTA functionalized agarose microspheres for the biosynthesis of 2- α -glucosylglycerol[J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 180: 108362.
- [11] ZHOU Y Y, KE F F, CHEN L Y, et al. Enhancing regioselectivity of sucrose phosphorylase by loop engineering for glycosylation of L-ascorbic acid[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(12): 4575-4586.
- [12] KRAUS M, GRIMM C, SEIBEL J. Reversibility of a point mutation induced domain shift: Expanding the conformational space of a sucrose phosphorylase[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 10490.
- [13] FEBRES-MOLINA C, SÁNCHEZ L, PRAT-RESINA X, et al. Glucosylation mechanism of resveratrol through the mutant Q345F sucrose phosphorylase from the organism *Bifidobacterium adolescentis*: A computational study[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2022, 20(26): 5270-5283.
- [14] KITAO S, ARIGA T, MATSUDO T, et al. The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* sucrose phosphorylase[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(12): 2010-2015.
- [15] DEMONCEAUX M, GOUX M, HENDRICKX J, et al. Regioselective glucosylation of (+)-catechin using a new variant of sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2023, 21(11): 2307-2311.
- [16] VAN DEN BROEK L A M, VAN BOXTEL E L, KIEVIT R P, et al. Physico-chemical and transglucosylation properties of recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083 [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 65(2): 219-227.
- [17] GUDIMINCHI R K, NIDETZKY B. Walking a fine line with sucrose phosphorylase: Efficient single-step biocatalytic production of L-ascorbic acid 2-glucoside from sucrose[J]. ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology, 2017, 18(14): 1387-1390.
- [18] AO J W, PAN X W, WANG Q, et al. Efficient whole-cell biotransformation for α -arbutin production through the engineering of sucrose phosphorylase combined with engineered cell modification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(5): 2438-2445.
- [19] ZHOU J W, JIANG R N, SHI Y, et al. Sucrose phosphorylase from *Lactobacillus reuteri*: Characterization and application of enzyme for production of 2-O- α -D-glucopyranosyl glycerol[J]. International

- Journal of Biological Macromolecules, 2022, 209(Pt A): 376-384.
- [20] LI Y, LI Z, HE X Y, et al. Characterisation of a *Thermobacillus* sucrose phosphorylase and its utility in enzymatic synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid[J]. Journal of Biotechnology, 2019, 305: 27-34.
- [21] 姚栋. 蔗糖磷酸化酶的高效表达及合成 α -熊果苷的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- YAO Dong. Efficient expression of sucrose phosphorylase and synthesis of α -arbutin [D]. Wuxi: Jiangnan university, 2020.
- [22] KWON T, KIM C T, LEE J H. Transglucosylation of ascorbic acid to ascorbic acid 2-glucoside by a recombinant sucrose phosphorylase from *Bifidobacterium longum*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(4): 611-615.
- [23] CHOI H C, SEO D H, JUNG J H, et al. Development of new assay for sucrose phosphorylase and its application to the characterization of *Bifidobacterium longum* SJ32 sucrose phosphorylase[J]. Food Science and Biotechnology, 2011, 20(2): 513-518.
- [24] 杨林莉. 重组蔗糖磷酸化酶的工程改造及应用[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- YANG Linli. Engineering modification and application of recombinant sucrose phosphorylase[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [25] MALAKAR P, VENKATESH K V. Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of *Escherichia coli* on glycerol due to the expression of Lac proteins[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2543-2549.
- [26] FERNÁNDEZ-CASTANÉ A, CAMINAL G, LÓPEZ-SANTÍN J. Direct measurements of IPTG enable analysis of the induction behavior of *E. coli* in high cell density cultures[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11: 58.
- [27] CASTELLANOS-MENDOZA A, CASTRO-ACOSTA R M, OLVERA A, et al. Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13: 137.
- [28] BLANCH H W, PRAUSNITZ J M, CURTIS R A, et al. Molecular thermodynamics and bioprocessing: From intracellular events to bioseparations[J]. Fluid Phase Equilibria, 2002, 194-197: 31-41.
- [29] 叶姣, 陈长华, 夏杰, 等. 温度对重组大肠杆菌生长及外源蛋白表达的影响[J]. 华东理工大学学报, 2002, 28(4): 364-367.
- YE Jiao, CHEN Changhua, XIA Jie, et al. Effect of temperature on the growth of recombinant *E. coli* and on the expression of recombinant protein[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2002, 28(4): 364-367.
- [30] ZHANG H, SUN X, LI W J, et al. Expression and characterization of recombinant sucrose phosphorylase[J]. The Protein Journal, 2018, 37(1): 93-100.
- [31] 刘萌, 王聪睿, 刘波, 等. 豇豆血红蛋白 Lb II 在大肠杆菌中的重组表达条件优化、纯化与鉴定[J]. 食品工业科技, 2023, 44(4): 163-170.
- LIU Meng, WANG Congrui, LIU Bo, et al. Optimization of expression conditions, purification and identification of the recombinant cowpea hemoglobin Lb II in *Escherichia coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(4): 163-170.

加工编辑: 刘艳美
收稿日期: 2023-12-19