

## 摘要

D-塔格糖作为稀少糖，除了具有热量低、口感好等特点外，还具有零血糖生成指数、益生元作用等生理学功能，已成为当下研究热点。目前主要通过化学法和生物法合成D-塔格糖，而现有生物法具有成本高、转化率受限等缺点。因此，寻找高效其它途径合成D-塔格糖极具研究意义和应用价值。D-果糖是D-塔格糖C-4位的差向异构体，价格低廉，是生产D-塔格糖的理想底物，因此，寻找能催化D-果糖合成D-塔格糖的新型酶成为破除D-塔格糖合成壁垒的关键。

石油热袍菌(*Thermotoga petrophila*)来源塔格糖酮酸 3-差向异构酶(Tagaturonate 3-epimerase)经分子改造后，能以D-果糖为底物合成D-塔格糖，其改造后被命名为塔格糖 4-差向异构酶(Tagatose 4-epimerase, T4E)。本研究以T4E为研究对象，对其重组表达，全细胞固定化进行探究，后续通过理性设计与定向进化策略对其进行热稳定性改造，并对获得的优势突变体进行酶学定性与应用效果探究，为T4E的工业化应用奠定了基础。

本论文主要研究结果如下：

(1) T4E在大肠杆菌中的重组表达、酶学性质测定及全细胞固定化研究。通过在T4E的N端融合T7 tag，成功实现其在*E. coli*中的重组表达，测定了其酶学性质，并对其全细胞固定化进行探究。结果显示，T4E的最适pH为8.5，最适温度为70°C，在该温度下半衰期为2.9 h。对全细胞固定化条件进行优化，最优条件为：海藻酸钠浓度(1%, w·v<sup>-1</sup>)、细胞包埋量(75 g·L<sup>-1</sup>)、CaCl<sub>2</sub>浓度(2%, w·v<sup>-1</sup>)、硅藻土浓度(1.5%, w·v<sup>-1</sup>)，在该条件下，固定化细胞的酶活回收率为66.7%。

(2) 理性设计提高T4E热稳定性。通过软件分析预测、T4E结构分析并结合B-因子、自由能( $\Delta G$ )等参数进行突变预测，根据二硫键策略构建了突变体I120C/G157C、A93C/L117C以及T276C/L300C；根据B-因子策略构建了突变体D213E、D250V、E322H以及E334G。分别测定了突变体的热稳定性与比活力，其中，突变体E322H热稳定性显著提高，但其比活力有一定程度的下降，酶转化结果显示其转化率低于野生型。结果表明，通过理性设计策略对T4E进行热稳定性改造目前尚存在一定的难度，后续需要寻找其它手段对T4E进行热稳定性改造。

(3) 定向进化提高T4E的热稳定性。构建了新型T4E高通量筛选方法，并用于T4E突变文库的高通量筛选，筛选获得了热稳定性显著提高的突变体I430P，以该突变体为亲本进行第二轮筛选，获得了比活力显著提高的突变体G90S/T272A/I430P，并对突变体进行了酶学性质测定与应用效果探究。突变体I430P半衰期( $t_{1/2}$ )为野生型的1.83倍，解折叠温度( $T_m$ )较野生型提高了5.1°C，突变体G90S/T272A/I430P其比活力较野生型提高了21.4%，半衰期( $t_{1/2}$ )为野生型的1.69倍，解折叠温度( $T_m$ )较野生型T4E提高了3.4°C。突变体I430P、G90S/T272A/I430P的酶转化应用效果与固定化应用效果均优于野生型。

**关键词：**塔格糖 4-差向异构酶；大肠杆菌重组表达；全细胞固定化；热稳定性；分子改造

## Abstract

D-tagatose, as a rare sugar, not only has the characteristics of low calorie and good taste, but also has physiological functions such as zero glycemic index and prebiotic effect, which has become a research hotspot. At present, D-tagatose is mainly synthesized by chemical and biological methods. However, the existing biological methods have the disadvantages of high substrate cost and limited conversion rate. Therefore, it is of great research significance and application value to find an efficient alternative way to synthesize D-tagatose. D-fructose is the differential isomer of C-4 of D-tagatose, which is low in price and is an ideal substrate for the production of D-tagatose. Therefore, finding new enzymes that can catalyze the synthesis of D-tagatose becomes the key to break down the barriers to the synthesis of D-tagatose.

After molecular modification of Tagaturonate 3-epimerase from *Thermotoga petrophila*, D-tagatose can be synthesized from D-fructose. The mutant was named Tagatose 4-epimerase (T4E). In this study, T4E was taken as the research object to explore its recombinant expression and whole-cell immobilization. Then, it was modified for thermal stability through rational design and directional evolution strategy, and the obtained dominant mutants were qualitative and applied in enzymology, which laid a certain foundation for the industrial application of T4E. The main research contents of this study are as follows:

(1) Recombinant expression, enzymatic properties and whole cell immobilization of T4E in *Escherichia coli*. The recombinant expression of T4E in *E. coli* was successfully achieved by fusion of T7 tag on the N-terminal of T4E, and the enzymatic properties of T4E were determined, and the whole cell immobilization of T4E was explored. Results show that the optimum pH of T4E is 8.5, the optimum temperature is 70 °C, the half-life of 2.9 h. The optimal immobilization conditions were as follows: sodium alginate concentration (1%, w·v<sup>-1</sup>), cell embedding amount (75 g·L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> concentration (2%, w·v<sup>-1</sup>), diatomite concentration (1.5%, w·v<sup>-1</sup>). Under these conditions, the enzyme recovery rate of immobilized cells was 66.7%.

(2) Rational design improves thermal stability of T4E. Through software analysis and prediction, T4E structure analysis and combination of B-factor, free energy ( $\Delta G$ ) and other parameters for mutation prediction, according to disulfide bond strategy to construct mutants, I120C/G157C, A93C/L117C and T276C/L300C, according to B-factor strategy to construct mutants, D213E, D250V, E322H and E334G. The thermal stability and specific activity of the mutant were measured respectively. The thermal stability of the mutant E322H was significantly improved, but its specific activity decreased to a certain extent. The conversion rate of the mutant was lower than that of the wild-type T4E. The results show that it is still difficult to carry out thermal stability transformation of T4E through rational design strategy, and other means should be found to carry out thermal stability transformation of T4E.

(3) Directed evolution improves the thermal stability of T4E. A novel T4E high-throughput screening method was constructed and used for high-throughput screening of T4E mutation libraries. A mutant I430P with significantly improved thermal stability was obtained through screening. The mutant G90S/T272A/I430P with significantly increased specific activity was obtained through the second round of screening using this mutant as the parent. Enzymatic

properties and application effects of the mutant were also studied. The half-life ( $t_{1/2}$ ) of the mutant I430P was 1.83 times that of the wild type, and the unfolding temperature ( $T_m$ ) was 5.1°C higher than that of the wild type. The specific activity of the mutant G90S/T272A/I430P was 21.4% higher than that of the wild type, and the half-life ( $t_{1/2}$ ) was 1.69 times higher than that of the wild type. The decomposition temperature ( $T_m$ ) was 3.4°C higher than that of wild type T4E. The enzyme conversion and immobilization effects of the mutant I430P, G90S/T272A/I430P were better than those of the wild type.

**Keywords:** Tagatose 4-epimerase; recombinant expression of *E. coli*; whole cell immobilization; thermostability; molecular modification

# 目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 D-塔格糖简介 .....	1
1.1.1 D-塔格糖的理化性质 .....	1
1.1.2 D-塔格糖的功能与应用 .....	1
1.1.3 D-塔格糖的合成 .....	1
1.2 塔格糖 4-差向异构酶(Tagatose 4-epimerase,T4E)概述.....	2
1.2.1 T4E 来源与性质 .....	3
1.2.2 大肠杆菌异源表达策略.....	3
1.2.3 固定化技术概述.....	4
1.3 酶热稳定性改造策略.....	5
1.3.1 酶热稳定性改造策略概述.....	5
1.3.2 理性设计提高酶分子的热稳定性.....	6
1.3.3 定向进化提高酶分子的热稳定性.....	7
1.4 立题依据及意义.....	7
1.5 本论文主要研究内容.....	8
第二章 材料与amp;方法 .....	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 菌种与质粒.....	9
2.1.2 培养基.....	9
2.1.3 试剂.....	9
2.1.4 主要实验仪器.....	9
2.2 分子操作.....	10
2.2.1 PCR 扩增 .....	10
2.2.2 定点突变.....	10
2.2.3 易错 PCR .....	10
2.2.4 大肠杆菌感受态的制备与转化.....	11
2.2.5 重组菌的摇瓶发酵.....	12
2.3 定向进化.....	12
2.3.1 高通量筛选方法的建立.....	12
2.3.2 突变文库的构建.....	13
2.3.3 突变文库的初筛与复筛.....	13
2.4 其它实验操作.....	13
2.4.1 菌体量测定.....	13
2.4.2 琼脂糖凝胶电泳及目的片段回收.....	14

2.4.3 蛋白电泳分析.....	14
2.4.4 蛋白纯化.....	14
2.4.5 蛋白浓度测定.....	14
2.4.6 T4E 酶活力测定.....	15
2.4.7 T4E 酶学性质测定.....	15
2.4.8 D-塔格糖的生物合成.....	16
2.4.9 HPLC 检测.....	16
2.4.10 分子动力学模拟.....	16
2.4.11 分子对接.....	16
2.4.12 T4E 全细胞固定化.....	16
2.4.13 固定化细胞酶学性质测定.....	17
2.4.14 固定化细胞的应用.....	18
第三章 结果与讨论.....	19
3.1 T4E 在大肠杆菌中的重组表达及全细胞固定化研究.....	19
3.1.1 T4E 表达与纯化.....	19
3.1.2 T4E 酶学性质测定.....	20
3.1.3 D-塔格糖合成条件优化.....	22
3.1.4 全细胞固定化条件优化.....	23
3.1.5 固定化细胞酶学性质及应用.....	26
3.2 理性设计提高 T4E 热稳定性.....	27
3.2.1 二硫键策略提高 T4E 热稳定性.....	27
3.2.2 二硫键突变体效果表征.....	28
3.2.3 B-因子策略提高 T4E 热稳定性.....	29
3.2.4 突变体效果表征.....	30
3.3 定向进化提高 T4E 热稳定性及其全细胞固定化.....	31
3.3.1 T4E 高通量筛选方法的建立.....	32
3.3.2 优势突变体表征.....	33
3.3.3 优势突变体酶学定性.....	34
3.3.4 优势突变体分析.....	35
3.3.5 D-塔格糖生物合成.....	36
3.3.6 突变体全细胞固定化应用.....	37
主要结论与展望.....	39
主要结论.....	39
展望.....	39
参考文献.....	41

## 第一章 绪论

### 1.1 D-塔格糖简介

随着全球肥胖患者的不断增加，人们对低卡路里甜味剂的重视与需求与日俱增，天然健康的稀少糖作为一种低卡路里甜味剂已成为当下的研究热点<sup>[1, 2]</sup>。目前已发现的稀少糖主要有D-阿洛酮糖、D-塔格糖、D-山梨糖等，其中D-塔格糖除了具有甜度高的特点外，还具有零血糖生成指数、无龋齿性、益生元作用和抗氧化活性等生理特性，使其在食品、医药和保健等多个领域均具有广泛的应用潜力<sup>[3]</sup>。

#### 1.1.1 D-塔格糖的理化性质

D-塔格糖作为一种天然存在的己酮糖，是D-果糖在C-4位的差向异构体，相对分子量为180.16，为白色结晶性粉末且易发生焦糖化反应和美拉德褐变反应，其甜度为蔗糖的92%，但能量仅为蔗糖的30%<sup>[4]</sup>，属于低热量甜味剂。D-塔格糖能够满足巧克力、口香糖、蛋糕、冰激凌等大量含糖产品对低卡路里甜味剂的需求，也能与一些高强度甜味剂产生协同作用<sup>[5]</sup>。2001年，D-塔格糖被美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准为食品添加剂，并通过“一般公认安全(Generally Recognized as Safe, GRAS)”认证，世界卫生组织联合食品添加剂委员会在同年推荐D-塔格糖为一种新的低热量甜味剂，可以作为食品添加剂使用。2014年，中国批准D-塔格糖为新食品原料，可以用在除婴幼儿食品以外的食品中，并且对其摄入量没有限制。

#### 1.1.2 D-塔格糖的功能与应用

D-塔格糖具有降低血糖浓度的能力<sup>[8]</sup>，有研究表明，机体摄入D-塔格糖后血糖水平无明显变化，而且D-塔格糖还能够抑制机体对葡萄糖的吸收，对II型糖尿病患者有辅助治疗的作用<sup>[9]</sup>，D-塔格糖还能用于辅助治疗贫血症和血友病<sup>[10]</sup>。D-塔格糖具有益生元作用，其在小肠内的吸收率很低，不被吸收的部分被大肠内的微生物发酵产生短链脂肪酸，这些短链脂肪酸对改善肠道菌群至关重要<sup>[6]</sup>。D-塔格糖还能起到抑制结肠癌、抑制肠道致病菌的作用<sup>[7]</sup>。D-塔格糖具有无龋齿性因而能够抗龋齿，由于其在口腔中产酸较低，不会降低牙斑的pH值，因此能有效防止龋齿的发生。此外，由于D-塔格糖具有零血糖指数和抗高血糖功能，其多用于预防治疗代谢综合征、血脂异常、冠心病和动脉粥样硬化等。

#### 1.1.3 D-塔格糖的合成

D-塔格糖在自然界中含量极低，目前主要通过化学或生物法进行合成<sup>[11]</sup>。化学法以D-半乳糖为原料，经两步反应制备D-塔格糖，其反应流程如图1-1(a)所示，在第一步反应中，催化剂(氯化钙)催化底物D-半乳糖与氢氧化钙反应，生成不溶性的络合物，该络合物在碱性环境中能够保持稳定。第二步反应是酸中和，在该过程中，酸与上一步

反应生成的D-塔格糖络合物发生中和反应，生成不溶性D-塔格糖复合物，后续通过过滤等操作即可获得产物D-塔格糖<sup>[12]</sup>。然而，化学法具有反应条件剧烈不易控制、易产生污染、工艺复杂、副产物较多不利于分离纯化等缺点<sup>[13]</sup>。

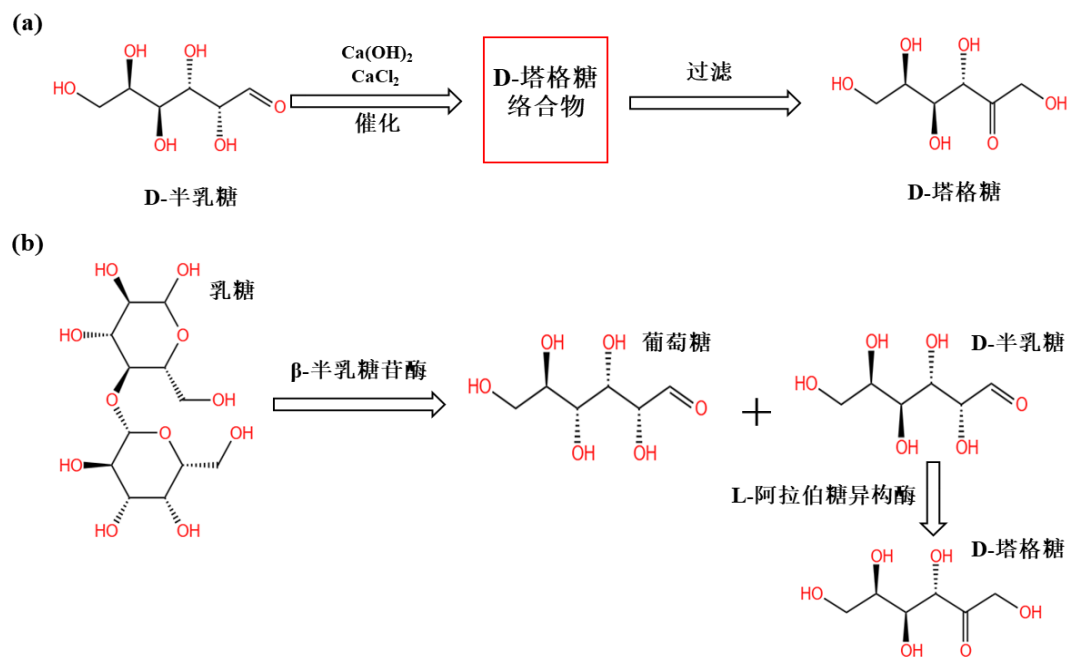


图 1-1 D-塔格糖的合成

(a) 化学合成; (b) 双酶法合成

Fig. 1-1 Synthesis of D-tagatose

(a) Chemical synthesis; (b) Double enzymatic synthesis

生物法制备D-塔格糖具有绿色环保、产物单一、分离纯化简单等优势，因此成为目前D-塔格糖合成的主要方法<sup>[14]</sup>。Jagtap等<sup>[15]</sup>使用来源于豆类根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)的半乳糖醇脱氢酶(Galactitol 2-dehydrogenase, GDH)催化D-半乳糖醇合成D-塔格糖，但由于底物D-半乳糖醇成本较高，因此，该方法的应用价值较低，此外该反应也需要还原型辅酶I(Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH)的参与，进一步增加了该方法的成本。因此，目前主要生产方法采用双酶法，即通过 $\beta$ -半乳糖苷酶与L-阿拉伯糖异构酶双酶协同催化乳糖合成D-塔格糖<sup>[16-18]</sup>，其反应流程如图 1-1 (b)所示。该方法需要经两步反应合成D-塔格糖：首先， $\beta$ -半乳糖苷酶水解乳糖生成中间产物D-半乳糖，再经L-阿拉伯糖异构酶催化合成D-塔格糖。但由于该方法的底物乳糖成本较高，且需要两步反应导致过程复杂；同时，受限于第一步乳糖水解导致底物的利用率较低，进一步增加了该方法的成本。因此，寻找制备D-塔格糖的其它高效途径极具研究意义及应用价值。

## 1.2 塔格糖 4-差向异构酶(Tagatose 4-epimerase, T4E)概述

D-果糖是D-塔格糖在C-4 位的差向异构体，且D-果糖比乳糖价格低，供应更稳定，是生产D-塔格糖的理想底物<sup>[19]</sup>。因此，寻找对D-果糖具有C-4 异构化活性酶，实现D-果糖到D-塔格糖的一步法合成，有助于推动D-塔格糖的工业化制备。



### 1.2.1 T4E来源与性质

石油热袍菌(*Thermotoga petrophila*)<sup>[20, 21]</sup>是严格厌氧的超嗜热菌，其最佳生长温度为 80°C<sup>[22]</sup>，Shin等人发现来源于*T. petrophila*塔格糖酮酸 3-差向异构酶(tagaturonate 3-epimerase)能够催化D-果糖酮酸合成D-塔格糖酮酸，通过后续研究发现该酶对D-果糖具有极低的C-4 差向异构化活性，随后通过分子改造进一步提高了该酶对D-果糖的C-4 差向异构化活性，最优突变体S125D/N129T/L140P/T181A/H362L的活性提高至野生型的184倍，该突变体被命名为塔格糖 4-差向异构酶(Tagatose 4-epimerase, T4E)<sup>[23]</sup>。T4E合成D-塔格糖的反应示意图如图 1-2 (a)所示，通过催化D-果糖C-4 位的羟基发生差向异构化反应进而实现D-塔格糖的一步法合成，图 1-2 (b)列出了影响T4E与D-果糖相互作用的关键氨基酸残基。

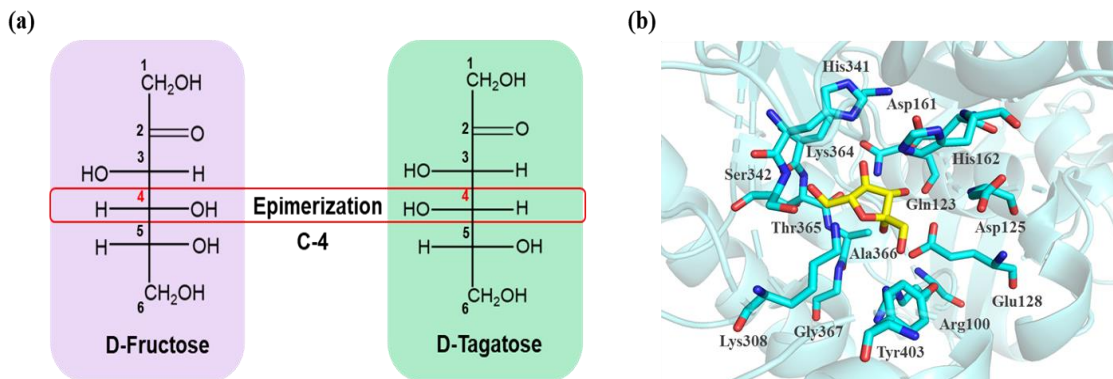


图 1-2 T4E催化D-果糖合成D-塔格糖反应示意图及其与D-果糖的分子对接

(a) T4E催化D-果糖与D-塔格糖之间的异构化反应；(b) T4E与D-果糖的分子对接(黄色：D-果糖，蓝色：关键氨基酸)

Fig. 1-2 Schematic diagram of T4E catalyzed synthesis of D-tagatose from D-fructose and its molecular docking with D-fructose

(a) T4E catalyzed isomerization reaction between D-fructose and D-tagatose; (b) Molecular Docking of T4E with D-fructose(yellow: D-fructose, blue: key amino acid)

T4E的比活力为  $0.12 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ，是严格的金属离子依赖酶，其最适金属离子为 $\text{Ni}^{2+}$ ，受限于T4E较差的热稳定性和较低的比活力，该酶目前还无法工业化应用，因此，提高T4E的热稳定性和比活力成为推动其工业化应用的主要手段。

### 1.2.2 大肠杆菌异源表达策略

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是常用的重组蛋白表达宿主<sup>[24]</sup>，具有遗传背景清晰、生长周期短、表达量高、分子操作简单等优势<sup>[25]</sup>。影响大肠杆菌重组蛋白表达的因素主要有启动子、重组蛋白类型、重组蛋白的稳定性、mRNA稳定性等<sup>[26]</sup>。此外，融合标签的使用也能够增强重组蛋白的可溶性表达<sup>[27]</sup>。Kim等人<sup>[28]</sup>在D-果糖脱氢酶的N端融合谷胱甘肽巯基转移酶(Glutathione S-transferase, GST)，显著提高了其在大肠杆菌中的重组表达水平；Sachdev等人<sup>[29]</sup>发现天冬氨酸蛋白酶在大肠杆菌中重组表达时多以包涵体形式存在，无明显可溶性条带，通过在其N端融合麦芽糖结合蛋白(Maltose-Binding Protein, MBP)，成功实现了天冬氨酸蛋白酶的可溶性表达；Dümmler等<sup>[30]</sup>通过在黄色

荧光蛋白(Yellow Fluorescent Protein, EYFP)的N端融合硫氧还蛋白(Thioredoxin, TrxA), 显著提高了其重组表达水平; 丘青霞<sup>[31]</sup>等通过在地衣芽孢杆菌来源的漆酶N端融合His-tag, 将其可溶性表达量提升 37 倍; Chatterjee<sup>[32]</sup>等通过在重组蛋白的N端融合T7 tag, 显著提高了重组蛋白的表达水平。相关研究表明, 目的基因mRNA二级结构的稳定性对重组蛋白的表达量影响较大<sup>[33]</sup>, 而融合标签通常是一些表达量较高的多肽, 其mRNA二级结构较为稳定, 对核糖体有着较高的结合能力, 因此, 在目的基因的 5'端添加融合标签基因序列可能有利于稳定mRNA的二级结构, 促进其与核糖体的结合, 进而提高重组蛋白的可溶性表达, 使其能够满足应用需求, 对于工业生产具有重要的研究意义。

### 1.2.3 固定化技术概述

酶作为高效的生物催化剂, 广泛应用于烘焙<sup>[34]</sup>、饮料<sup>[35]</sup>、造纸<sup>[36]</sup>、制药<sup>[37]</sup>、废水处理<sup>[38]</sup>等领域, 但受限于酶分子自身的稳定性, 难以满足极端的应用场景要求。酶固定化技术可以在一定程度上克服上述问题, 提升酶分子的稳定性和可重复利用性。

固定化技术是将酶限制在有限空间内, 使其能够重复使用的一种技术, 根据固定化原理的不同, 一般将固定化技术分为吸附、包埋、交联和共价结合<sup>[39]</sup>, 如图 1-3 所示。吸附法是利用各种吸附剂将酶吸附固定在材料表面, 常用的吸附剂有硅藻土、硅胶、氧化铝等。Cabrera等人<sup>[40]</sup>使用 3-羟基丁酸酯-共羟基戊酸酯(Polyhydroxybutyrate-co-valerate, PHBV)为吸附剂, 对皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)来源的脂肪酶进行固定化, 经过 12 次重复使用, 残余酶活仍保持在 50%以上。该方法的优点是操作简便、条件温和, 载体廉价且能反复使用, 但该方法的结合力较弱, 细胞和酶易脱落。包埋法是将酶包埋在载体内进而实现固定化<sup>[41]</sup>。Zou等人<sup>[42]</sup>以改性二氧化硅为载体, 通过包埋法对猪胰脂肪酶进行固定化, 固定化酶保持了良好的热稳定性, 在 65°C下孵育 3 h后仍保持 92%以上的活性。包埋法的包埋效果受载体孔隙尺寸影响较大, 孔隙过大会导致酶分子渗漏, 孔隙太小则会影响底物分子的传质效率。交联法是利用交联试剂在酶分子与载体进行交联反应从而实现固定化。Yang等人<sup>[43]</sup>使用聚乙二醇对南极假丝酵母(*Candida antarctica*)来源的脂肪酶进行交联法固定化, 结果显示固定化酶的操作稳定性和储存稳定性均有明显提升。该方法结合能力强, 但是该方法操作较复杂且酶的活性可能会受到交联的负面影响。共价结合法是通过共价键将酶和载体进行偶联形成固定化酶, Tee等人<sup>[44]</sup>使用海藻酸钙基质对耐热 $\alpha$ -淀粉酶进行共价结合固定化, 于 95°C下进行淀粉的水解反应, 进行 7 个循环反应后, 固定化酶的淀粉水解量为 53 g·mg<sup>-1</sup>(淀粉/酶), 高于游离酶的水解量 34.2 g·mg<sup>-1</sup>(淀粉/酶), 并且固定化酶显示出优良的可重复利用性。该方法结合牢固, 可以连续使用多次, 但操作复杂, 并且可能会影响酶的活性。不同类型的固定化技术特点各异, 因此, 根据应用需求及酶分子的理化特点选择适合的固定化方法至关重要。

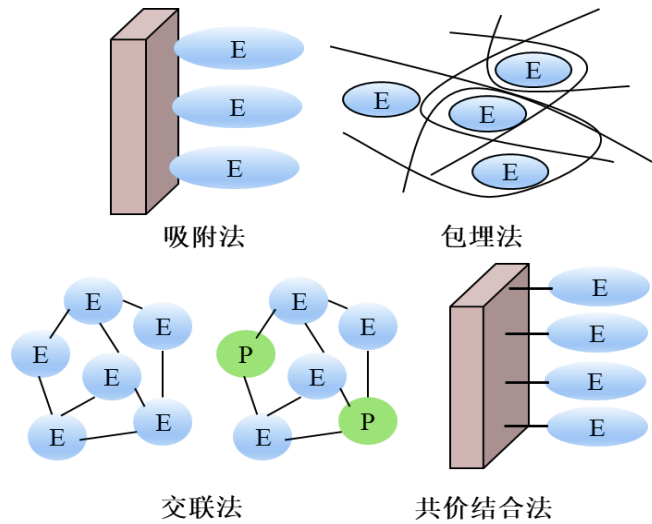


图 1-3 固定化方法(E: 酶分子, P: 交联剂)

Fig. 1-3 Immobilization methods

全细胞固定化是将微生物活细胞利用物理或化学方法固定，使其作为固体生物催化剂而利用的一种技术，与酶固定化相比，细胞固定化具有制备成本低、酶活损失低、制备简便等优势。高温环境中，细胞膜蛋白易变性形成小孔，导致细胞膜的通透性增加，进而使其对底物的屏障作用降低，从而使底物更易进入细胞内部，有利于全细胞固定化反应速率的提升<sup>[45]</sup>。此外，全细胞固定化技术也避免了细胞破壁和蛋白纯化带来的成本提升，因此，全细胞固定化技术在工业化应用中，具有一定的应用潜力。吸附-包埋法作为一种常规的全细胞固定化方法，不仅成本低，而且固定化工艺也更加成熟。此外，海藻酸钠具有较好的包埋作用且能够避免细胞的渗漏，而硅藻土具有优良的吸附能力，二者常被作为吸附载体用于固定化技术中，因此本研究选择硅藻土-海藻酸钠进行全细胞固定化<sup>[37]</sup>。

## 1.3 酶热稳定性改造策略

### 1.3.1 酶热稳定性改造策略概述

酶分子由于具有较高的催化效率及底物特异性，被广泛应用于食品、化工以及制药等领域。同时，在制糖工业中，高温有利于提升反应速率、降低反应液粘度、防止染菌，因此，热稳定性作为酶分子的关键性能之一，对其应用具有重要影响<sup>[46]</sup>，提高酶分子的热稳定性具有重要的研究意义<sup>[47]</sup>。

近年来，许多与酶分子热稳定性相关的因素被发掘，主要包括二硫键<sup>[48]</sup>、疏水相互作用<sup>[49]</sup>、氢键<sup>[50]</sup>、盐桥<sup>[51]</sup>、疏水相互作用等<sup>[52]</sup>。随着对蛋白质热稳定性机制的研究深入，许多提高热稳定性的理性设计策略被广泛应用，如二硫键添加、脯氨酸效应分析<sup>[53]</sup>及蛋白表面电荷优化等<sup>[46]</sup>。此外，随着结构生物学与信息生物学的发展，通过对一些结构参数(如B-因子、自由能( $\Delta G$ )等)的分析或同源序列比对，较准确地定位影响酶分子热稳定性的区域，进而对其进行改造以提高酶分子的热稳定性。但对于一些目前尚没有晶体结构或催化机制尚未明晰的目标酶，往往可能出现理性设计成功率较低的情况。

定向进化不依赖酶分子的结构信息和催化机制，仅通过随机突变和高通量筛选便可获得理想的突变体，不仅能够获得符合理性设计原则的突变体，还能得到现有理性设计原则无法覆盖的优势突变体。近年来，通过定向进化获得了众多性能优良的工业酶，进一步证明该方法在分子改造方面具有显著优势。

### 1.3.2 理性设计提高酶分子的热稳定性

理性设计是根据酶分子的结构、功能和催化机制等信息对其进行结构设计和改造。近年来，通过理性设计对酶分子的稳定性、催化活性、底物特异性等性能进行改造已成为一种常规的策略。通过理性设计提升酶分子的热稳定性具有较为广泛的前景，其流程如图 1-4 所示，而二硫键、疏水相互作用、表面电荷、氢键等热稳定性相关机制的解析更大大提高了理性设计提高热稳定性的成功率。

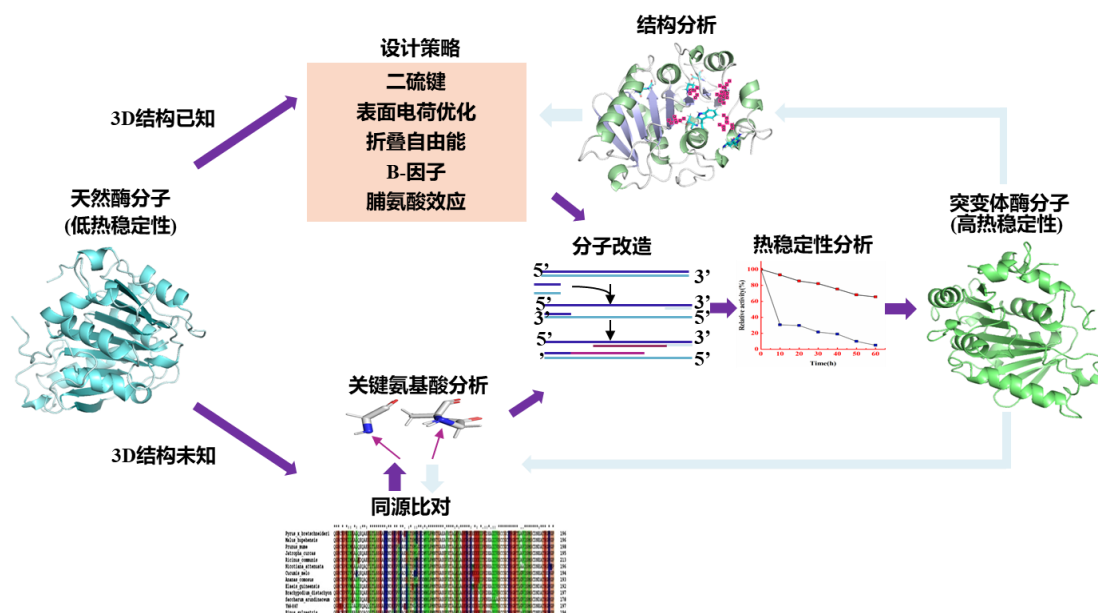


图 1-4 理性设计提升酶热稳定性流程

Fig. 1-4 Rational design to improve the thermal stability of enzymes

二硫键是酶分子中两个半胱氨酸之间的巯基(-SH)被氧化而形成的共价键，其对酶分子的热稳定性具有非常重要的影响。空间上接近的两个半胱氨酸之间可以形成二硫键<sup>[55]</sup>，在酶分子内引入二硫键已被广泛用于改善酶分子的热稳定性，Sakai等<sup>[56]</sup>人在葡萄糖脱氢酶中引入二硫键，获得的突变体半衰期是野生型的 13 倍，热稳定性显著提高；Zheng等<sup>[57]</sup>人在甲醇脱氢酶中引入二硫键，突变体的半衰期延长了 6.7 倍；Kanaya等<sup>[58]</sup>人在核糖核酸酶中引入二硫键，突变体的 $T_m$ 值较野生型提高了 11.8°C。在酶分子中引入二硫键以提高其热稳定性是目前常用的热稳定性策略，不同于氢键、离子键、疏水作用等，二硫键是共价键，其对酶分子热稳定性的增强更加显著，因此，对于T4E，可以尝试引入二硫键提高其热稳定性。

以酶分子的结构为基础结合一些常规的酶分子改造策略(脯氨酸效应、表面电荷优化、二硫键设计、同源比对等)对酶分子进行突变设计，亦能获得性能优良的突变体。徐书琴<sup>[59]</sup>等通过序列比对和同源模拟对L-天冬酰胺酶进行定点突变设计，获得的优势突变体M92A与野生型相比半衰期延长了 30 min；Mao等<sup>[60]</sup>人对D-阿洛酮糖 3-差向异构

酶的柔性区域进行B-因子计算，对B-因子较高的氨基酸进行突变，突变体L144F的半衰期延长了 50.4 min。然而，该方法受限于酶分子的结构、酶与底物的作用方式以及催化机制<sup>[61]</sup>。

### 1.3.3 定向进化提高酶分子的热稳定性

定向进化是在基因水平上构建目标酶的突变体文库，通过合适的筛选压力获得性能优良的突变体<sup>[62]</sup>。定向进化可以按照需要对酶进行改造，甚至获得自然界中不存在的新酶分子，该技术对酶分子的结构信息和性质参数的依赖性不高，仅通过随机突变或基因重组获得突变基因文库，进而获得突变蛋白文库。

近年来，定向进化已广泛应用于酶分子的改造中，Sun等<sup>[63]</sup>通过定向进化对多磷酸依赖性甘露糖激酶(Polyphosphate-dependent glucomannokinase, PPGMK)进行分子改造，获得的最佳突变体H92K/E119R，其比活力是野生型的 2 倍，50°C下的半衰期为 243 分钟，为野生型的 5.4 倍；姚友旭等<sup>[64]</sup>通过定向进化对内切葡聚糖酶进行改造，获得的最优突变体酶活力是野生型的 3.6 倍；Kotzia等<sup>[65]</sup>对L-天冬酰胺酶的第 133 位氨基酸进行饱和突变，后续对其进行筛选，获得的突变体D133V在 50°C下的半衰期提高了 157 h。定向进化将随机突变与定向筛选相结合，能够与理性设计互补，更有助于提高酶分子在工业环境中的性能，适用于工业酶的分子改造。

## 1.4 立题依据及意义

近些年来随着国民经济的不断发展，人们对一些高热量甜味剂的摄取量大幅增加，从而导致肥胖、高血糖、心血管疾病等的发病率不断增加，而一些新型人工甜味剂如阿斯巴甜、三氯蔗糖等则存在一系列的安全问题<sup>[66]</sup>。因此，开发天然健康的稀少糖作为低热量甜味剂代替传统的高热量甜味剂，已成为了近些年来研究热点。在目前已发现的稀有糖中，D-塔格糖的热量不到蔗糖的 30%，而甜度为蔗糖的 92%<sup>[4]</sup>，此外，D-塔格糖还能够减少肥胖、改善肠道菌群、抗龋齿<sup>[9, 10, 67-69]</sup>。2001 年，D-塔格糖被 FDA批准为GRAS级别的食物添加剂，2014 年，中国批准D-塔格糖为新食品原料，可以用在除婴幼儿食品以外的食品中。由于D-塔格糖独特的生理功能和营养价值，近些年来食品、制药和保健等领域对其需求不断增加，使其成为极具竞争力的稀少糖产品之一。

D-塔格糖在自然界中的含量极低，难以满足应用需求，主要通过人工手段进行合成，而现有的制备方法则存在一定的缺陷，导致其应用受限。因此，目前亟需寻找D-塔格糖合成的新途径，进一步推动其工业化应用。T4E能以廉价的D-果糖为底物通过差向异构化反应合成D-塔格糖，该方法不仅具有环境友好、分离纯化简单、反应条件温和的特点，还具有反应单一、成本低等优势，具有较好的应用前景。但受限于T4E的热稳定性与比活力，该方法目前尚未工业化应用，因此，提高T4E的热稳定性和比活力，使其能够满足工业化需求是目前亟需解决的问题，此外通过全细胞固定化技术提升T4E在高温条件下反应的稳定性和重复使用次数对降低其应用成本具有重要意义。

## 1.5 本论文主要研究内容

本研究从T4E出发，通过在其N端融合T7 tag提升其在大肠杆菌中的重组表达水平并对其酶学性质进行测定，随后对T4E的全细胞固定化进行研究；利用理性设计和定向进化技术对T4E进行分子改造以提高其热稳定性和比活力并测定了突变体的酶学性质、对优势突变体进行结构分析与应用效果探究。主要研究内容如下：

(1) T4E在大肠杆菌中的重组表达及全细胞固定化研究。融合T7 tag提升T4E在大肠杆菌中的重组表达水平，并对其酶学性质进行测定，对T4E的全细胞固定化进行条件优化与应用探究。

(2) 理性设计提高T4E的热稳定性。通过在线软件预测以及对T4E的结构参数进行分析，设计构建二硫键突变体和B-因子突变体以提升T4E的热稳定性并考察突变体的应用效果，并对优势突变体进行结构分析与机制解释。

(3) 定向进化提高T4E的热稳定性。通过随机突变构建T4E突变文库，利用构建的新型T4E高通量筛选方法，通过筛选获得热稳定性显著提高的突变体，对优势突变体的酶学性质进行测定，后续对其进行结构分析、应用效果探究以及全细胞固定化研究。

## 第二章 材料与amp;方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 菌种与质粒

克隆宿主*E. coli* JM109, 表达宿主*E. coli* BL21 (DE3)存于本实验室菌种库, T4E由481个氨基酸组成, 理论分子量为58.4 kDa, NCBI登录号: ABQ46504, 质粒pET-24a(+)-*t4e*由苏州安升达生物科技有限公司合成。

#### 2.1.2 培养基

LB培养基(g·L<sup>-1</sup>): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10。

TB培养基(g·L<sup>-1</sup>): 蛋白胨 12, 酵母粉 24, 甘油 10, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 16.43, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.3。

#### 2.1.3 试剂

(1) HEPPS缓冲液(mmol·L<sup>-1</sup>): 20, 使用氢氧化钠调节pH至8.5。

(2) 蛋白纯化缓冲液

缓冲液A(mmol·L<sup>-1</sup>): Tris-HCl 25, NaCl 500, 使用氢氧化钠调节pH至7.2-7.4。

缓冲液B(mmol·L<sup>-1</sup>): Tris-HCl 25, NaCl 500, 咪唑 300, 使用氢氧化钠调节pH至7.2-7.4。

4-(2-羟乙基)-1-哌嗪丙磺酸(HEPPS)、D-果糖均购于麦克林生化科技有限公司(上海), 间苯二酚购自阿达玛斯试剂有限公司(上海), 质粒提取试剂盒与DNA胶回收试剂盒均购自康为生物科技有限公司(北京), 活性干酵母购自安琪酵母股份有限公司(上海), Ni<sup>2+</sup>柱填料购自GE Healthcare公司(北京), D-果糖、D-塔格糖标品购自维塔化学试剂有限公司(上海), 其他常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司(北京), 分子操作相关试剂购自于宝日医生物技术有限公司(北京)。引物、基因合成及测序工作均由安升达生物科技有限公司(苏州)完成。

#### 2.1.4 主要实验仪器

本研究所用实验仪器如表 2-1 所示

表 2-1 主要实验仪器

Table 2-1 Main experimental instrument

仪器	厂家
Agilent 1200 HPLC	美国Agilent Technology公司
Agilent HPLex Ca色谱柱	美国Agilent Technology公司
超声细胞破碎机	宁波新芝生物科技股份有限公司
差示扫描微量热仪(Nano-DSC)	美国TA Instruments公司
高压匀浆机	意大利GEA Niro Soavi公司
ProFlex型PCR仪	美国Thermo Fisher Scientific公司
高速冷冻离心机	美国Beckman Coulter公司
酶标仪	南京拜尔沃克智能科技有限公司
水浴恒温振荡器	上海知楚仪器有限公司
蒸汽灭菌器	上海医用核子仪器厂
紫外可见分光光度计	北京普析通用仪器公司
多功能凝胶图像分析系统	上海天能科技公司
分析天平	上海奥豪斯仪器公司
移液器、离心机	德国Eppendorf公司

## 2.2 分子操作

### 2.2.1 PCR扩增

PCR: 以pET-24a(+)-*t4e*为模板, T7-F/R为上下游引物(表 2-2), 进行PCR扩增。PCR体系(50  $\mu\text{L}$ ): 50 ng模板, 25  $\mu\text{L}$  2 $\times$ Phanta Max Master Mix酶, 1  $\mu\text{L}$ 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ddH<sub>2</sub>O补齐。PCR方法按Vazyme说明书设置, 其中, 退火温度为引物 $T_m$ 值减 5 $^{\circ}\text{C}$ , 延伸时间为 60 s $\cdot\text{kb}^{-1}$ , PCR结束后将PCR产物于 10 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。

### 2.2.2 定点突变

定点突变: 反应体系 1 (25  $\mu\text{L}$ ): 25 ng模板, 12.5  $\mu\text{L}$ 酶 2 $\times$ Phanta Max Master Mix, 0.5  $\mu\text{L}$ 上游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ddH<sub>2</sub>O补齐。反应体系 2 (25  $\mu\text{L}$ ): 25 ng模板, 12.5  $\mu\text{L}$ 酶 2 $\times$ Phanta Max Master Mix, 0.5  $\mu\text{L}$ 下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ddH<sub>2</sub>O补齐。PCR方法按Vazyme说明书设置, 其中, 退火温度为引物 $T_m$ 值减 5 $^{\circ}\text{C}$ , 循环数为 60 s $\cdot\text{min}^{-1}$ , PCR结束后将PCR产物于 10 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。上述PCR结束后, 将体系 1 和体系 2 的PCR产物均匀混合后再次进行PCR反应, PCR方法按Vazyme说明书设置, 其中, 退火温度为引物 $T_m$ 值减 5 $^{\circ}\text{C}$ , 延伸时间为 60 s $\cdot\text{kb}^{-1}$ , PCR结束后将PCR产物于 10 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。取 10  $\mu\text{L}$  PCR产物, 加入 1  $\mu\text{L}$  *Dpn* I酶和 1  $\mu\text{L}$  buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 进行模板消化。

### 2.2.3 易错PCR

以pET-24a(+)-*t4e*为模板, EP-F/R为引物, 扩增*t4e*基因。PCR体系(50  $\mu\text{L}$ ): 50 ng模板, 5  $\mu\text{L}$  10 $\times$ PCR buffer, 0.5  $\mu\text{L}$  rTaq酶, 1  $\mu\text{L}$ 上下游引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 4  $\mu\text{L}$  dNTP mix, 终浓度为 0.15  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Mn}^{2+}$ , ddH<sub>2</sub>O补齐。PCR方法按Vazyme说明书设置, 其中, 退火温度为引物 $T_m$ 值减 5 $^{\circ}\text{C}$ , 循环数为 60 s $\cdot\text{min}^{-1}$ , PCR结束后将PCR产物于 10 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。之后将PCR产物进行核酸电泳, 确认条带大小正确后, 进行切胶回收。



以回收的目的片段为引物，以MEGAWHOP<sup>[7]</sup>法进行PCR以扩增全质粒。PCR体系与 2.2.2 体系相同，将上下游引物替换为胶回收片段，PCR方法按Vazyme说明书设置，其中，退火温度为引物 $T_m$ 值减 5℃，延伸时间为 60 s·kb<sup>-1</sup>，PCR结束后将PCR产物于 10℃下保存。之后将PCR产物进行消模板处理并将其转化至目标菌株内。

表 2-2 引物序列

Table 2-2 Primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')
T7-F	TTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCA AATGGGTCGCGGATCCATGGTTCTGAAA
T7-R	TTTCAGAACCATGGATCCGCGACCCATTTGCTGTCCACCAGTCATGC TAGCCATATGTATATCTCCTTCTTAAA
EP-F	ATATTTTCCGGATCTGAAACCGGTTAGA
EP-R	TCATTTTGTTCAGTGTTTTAAACAGTCTTTCTTT
A93C-F	TTAGAGCGGGCCTGAGATGTTTCAATTTGGCACGGG
A93C-R	CCCGTGCCAAATGAACATCTCAGGCCCGCTCTAA
L117C-F	CTGAAAGATAGCGGCTGTTTTCCGTGTTTTGCA
L117C-R	TGCAAACACGGAAAACAGCCGCTATCTTTCAG
I120C-F	AGCGGCTGTTTTCCGTGTTTTGCACAACAAGAT
I120C-R	ATCTTGTTGTGCAAACACGGAAAACAGCCGCT
G157C-F	TATTCAGAAGGCTTTTGTGCAGATGCAGATCAT
G157C-R	ATGATCTGCATCTGCACAAAAGCCTTCTGAATA
T276C-F	GAAACAGAAACACCGTGTTACCGCTGTTTCAT
T276C-R	ATGAAACAGCGGTGAACACGGTGTTCCTGTTTC
L300C-F	TTTACAAATCTGGCATGTAGATTTATTGGCGAA
L300C-R	TTCGCCAATAAATCTACATGCCAGATTTGTAAA
D213E-F	GAGAAAAGAAAGAATTGAGAGAATTTATCTGGGG
D213E-R	GCCCAGATAAATTCTCTCAATTCTTTCTTTCTC
D250V-F	TGCAATTGCACATGTTGTTATGATGTATCAA
D250V-R	TTGATACATCATAACAACATGTGCAATTGCA
E322H-F	GCACAATTTGAAAGACACATTAATAATGCATGCA
E322H-R	TGCATGCATTTTAATGTGTCTTTCAAATTGTGC
E334G-F	GCAAGAATGTTTGGAGGCTATAAAAATTTCACTGC
E334G-R	GCAGTGAAATTTTATAGCCTCCAACATTCTTGC

## 2.2.4 大肠杆菌感受态的制备与转化

*E. coli* BL21 (DE3)感受态的制备:

- (1) 将保存的*E. coli* BL21 (DE3)菌株划线接种，并于 37℃无菌培养箱内静置培养 10-12 h;
- (2) 选取平板上大小合适的单菌落挑菌转接至 5 mL的液体LB培养基中，37℃，200 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 8-10 h;
- (3) 取培养完成的菌液 100 μL加入到 50 mL的LB培养基中，并于 37℃，200 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 3 h左右，其间测量菌体浓度保证OD<sub>600</sub>为 0.6 左右;
- (4) 将培养好的菌液置于冰盒内冰浴 30 min，充分冷却，将冰浴完成后的菌液转移至提前预冷灭菌过的 50 mL离心管中，于 4℃、4000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min，收集菌体;
- (5) 将离心后的菌体用 20 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的CaCl<sub>2</sub>溶液吹洗重悬，之后将其置于冰盒

内冰浴 30 min, 于 4°C、4000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 收集菌体;

(6) 重复步骤 5;

(7) 向留有菌体的离心管内加入 1.5 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 的CaCl<sub>2</sub> 溶液和 0.5 mL浓度为 60% (w/v)的甘油, 吹洗混匀。

(8) 分装, 将菌悬液分装至 1.5 mL 灭过菌的离心管内, 100 μL每管, 并于-80°C下保存备用。

*E. coli* BL21 (DE3)的转化:

(1) 提前 5 min将*E. coli*感受态细胞和消完模板后的PCR产物放于冰盒内备用;

(2) 将 10 μL的PCR产物加入到感受态细胞内并吹洗混匀, 之后与冰盒内冰浴 30 min;

(3) 将冰浴完成的细胞于 42°C下水浴热激 90 s;

(4) 将热激完成的感受态细胞于冰盒内冰浴 5 min;

(5) 向离心管中加入 800-900 μL的培养基, 密封后于 37°C, 200 r·min<sup>-1</sup> 下震荡培养 45-60 min;

(6) 将培养后的菌液于 3000 r·min<sup>-1</sup> 下离心 4 min, 留取 200 μL的离心上清, 并将多余的弃去, 菌体吹吸混匀后, 将菌悬液均匀涂布在固体平板上, 于 37°C培养箱内静置培养 10-12 h。

### 2.2.5 重组菌的摇瓶发酵

将保存的*E. coli* BL21 (DE3)/pET-24a(+)-*t4e*菌液以 2%量加入到LB培养基中(卡那霉素 30 μg·mL<sup>-1</sup>)并于 37°C、200 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 10·h左右。将培养完成后的菌液以 5%量加入到TB培养基(卡那霉素 30 μg·mL<sup>-1</sup>)中, 并于 37°C、200 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 2 h, 至OD<sub>600</sub>为 0.6左右, 随后改变培养温度, 于 25°C、200 r·min<sup>-1</sup>下培养 24 h, 进行诱导表达。

## 2.3 定向进化

### 2.3.1 高通量筛选方法的建立

分别配制 25 g·L<sup>-1</sup>的D-果糖和 25 g·L<sup>-1</sup>的D-塔格糖溶液, 并将二者按 1:1 混合, 配制成含 12.5 g·L<sup>-1</sup>的D-果糖与 12.5 g·L<sup>-1</sup>的D-塔格糖的溶液。

摇瓶消化实验: 分别取 10 mL上述溶液于锥形瓶内, 并向其中加入 50 mg的活性干酵母, 密封后于 30°C, 200 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 24 h, 期间每隔 2 h取样, 并将样品煮沸 10 min灭活, 之后于 12000 r·min<sup>-1</sup>下离心 10 min, 将上清进行液相检测。

浅孔板消化实验: 分别取 200 μL上述溶液于浅孔板中, 并向其内加入 20 μL的干酵母溶液(干酵母母液浓度为 50 g·L<sup>-1</sup>), 密封后于 30°C, 750 r·min<sup>-1</sup>下震荡培养 24 h。培养结束后, 将浅孔板于 4000 r·min<sup>-1</sup>下离心 15 min, 取 100 μL的离心上清于深孔板中, 并向每孔内其中加入 100 μL的Seliwanoff试剂, 密封后于沸水浴中精准反应 10 min, 冰浴冷却后取 150 μL的反应液于浅孔板中, 使用酶标仪测定 400 nm处吸光度。

Seliwanoff试剂(现配现用)的配制：称取一定量的间苯二酚溶于 12%的盐酸(浓盐酸稀释三倍)，间苯二酚终浓度为  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.3.2 突变文库的构建

(1) 按 2.2.3 所示的方法构建关于T4E的突变文库，待平板上的菌落大小数量合适后，挑取单菌落进行建库。

(2) 向无菌 96 浅孔板每孔加入  $200\ \mu\text{L}$ 的LB液体培养基(卡那霉素  $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )，使用灭菌后的牙签将平板上的单菌落挑取至含有LB液体培养基的浅孔板每孔内，并分别设置空白对照和野生型对照。

(3) 将 96 浅孔板密封后，于  $37^\circ\text{C}$ ， $700\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下震荡培养 10 h左右。

(4) 向灭菌后的 96 深孔板每孔加入 1 mL的TB培养基(卡那霉素  $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )，将浅孔板内的种子液以 5%接种量转接至深孔板内，将深孔板使用纱布密封后于  $37^\circ\text{C}$ 、 $750\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下振荡培养 2 h，之后改变培养温度为  $25^\circ\text{C}$ 培养 24 h。向浅孔板中剩余的菌液内加入  $50\ \mu\text{L}$ 灭菌后的甘油( $60\%$ ， $\text{w}\cdot\text{v}^{-1}$ )，密封后保存在 $-80^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。

(5) 深孔板发酵结束后，将其于  $4^\circ\text{C}$ 、 $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 15 min，将离心后的发酵上清丢弃，剩余菌体保存在 $-20^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。

### 2.3.3 突变文库的初筛与复筛

突变文库的初筛：

(1) 向留有菌体的深孔板每孔内加入  $300\ \mu\text{L}$ 的HEPPS缓冲液(含  $50\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  D-果糖和  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{Ni}^{2+}$ )混匀，之后将其于  $60^\circ\text{C}$ 下进行酶反应，反应时间为 2 h。

(2) 反应结束后，将深孔板进行离心，之后取  $200\ \mu\text{L}$ 离心后的上清于浅孔板中，并加入  $20\ \mu\text{L}$ 的干酵母溶液(干酵母浓度  $50\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )吹洗混匀密封后于  $30^\circ\text{C}$ 、 $750\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下反应 24 h，进行酵母消化处理。

(3) 将消化后的浅孔板于  $4000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 15 min，取  $100\ \mu\text{L}$ 离心上清于深孔板中，并向每孔内加入  $100\ \mu\text{L}$ 的Seliwanoff试剂，密封后于沸水浴中精准反应 10 min，反应结束后冰浴冷却，随后取  $150\ \mu\text{L}$ 于浅孔板中，使用酶标仪测定  $400\ \text{nm}$ 处吸光度。

(4) 选取吸光值高于野生型的突变体进行 96 孔板复筛，复筛方法与初筛基本一致，每组设置三个平行，重复以上筛选过程。之后将孔板复筛中具有较高潜力的突变，进行摇瓶复筛，并对突变体进行比活力和热稳定性测定。

## 2.4 其它实验操作

### 2.4.1 菌体量测定

(1) 菌体湿重：取一定体积的发酵液于  $12000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min，收集菌体，使用缓冲液将菌体重悬并将其于  $12000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min，之后使用天平对其进行质量测量即为菌体湿重。

(2) 菌体浓度( $\text{OD}_{600}$ )：将菌液进行适度稀释并提前打开分光光度计并将其将波长调

至 600 nm，将比色皿清洗干净后向其中加入去离子水进行校零，随后将稀释后的菌液加入比色皿中进行测量， $OD_{600} = \text{吸光值} \times \text{稀释倍数}$ 。

#### 2.4.2 琼脂糖凝胶电泳及目的片段回收

称取 0.3 g 的琼脂糖，向其中加入于 30 mL 的核酸 Buffer 并加热溶解，待其完全溶解后加入 1.5  $\mu\text{L}$  的 Gold View，混匀后将其倒入核酸胶板内，30 min 后，将胶块取出加入电泳槽内，将核酸 Marker 和样品分别加入核酸胶内，90 V 下进行核酸电泳。电泳结束后，将单一明亮且大小与目的基因一致的条带切下，按照 DNA 回收试剂盒说明书的步骤进行胶回收操作。

#### 2.4.3 蛋白电泳分析

按照说明书上的方法步骤配制蛋白胶，将处理好的样品和蛋白 Marker 分别加样，每孔 8  $\mu\text{L}$ ，之后于 200 V 下进行蛋白电泳，电泳完成后进行剥胶、染色、脱色、照胶。

#### 2.4.4 蛋白纯化

(1) 使用 pH 8.5 的 HEPPS 缓冲液将菌体重悬混匀，提前打开高压匀浆机进行预冷并清洗干净，将重悬后的菌液加入样品池并在 800-900 bar 下对菌液进行破壁，每个样品破壁时间为 3 min。

(2) 将破壁后的菌液于 4°C、8000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 20 min 收集上清液，将离心后的上清液使用 0.22  $\mu\text{m}$  滤头进行过滤以除去杂质。

(3) 先用 100 mL 的去离子水冲洗镍柱除去残留的乙醇，然后用 100 mL 的缓冲液 A 冲洗镍柱进行柱平衡，随后将粗酶液在低流速下挂柱，重复挂柱三次。

(4) 用 100 mL 的缓冲液 A 对镍柱进行冲洗以除去结合能力较弱的杂蛋白，随后分别用 60 mL 30  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的咪唑溶液、60 mL 60  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的咪唑溶液洗脱杂蛋白；然后分别用 60 mL 90  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、60 mL 150  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的咪唑溶液洗脱目的蛋白。

(5) 提前向 10 kDa 大小的超滤管中加入去离子水并于 4°C、3500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 20 min 进行超滤清洗，然后将含有目的蛋白的洗脱液加入超滤管内进行超滤，超滤结束后，向超滤管内加入一定体积的 HEPPS 缓冲液进行超滤以置换缓冲液，超滤完成后，将酶液收集保存备用。

#### 2.4.5 蛋白浓度测定

(1) 蛋白标品的配制：按蛋白浓度测定试剂盒说明书配制蛋白标品

表 2-3 蛋白标品的配制

Table 2-3 Formula for protein standard

名称	水 ( $\mu\text{L}$ )	蛋白样品 ( $\mu\text{L}$ )	蛋白浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
A	70	30 BSA	1.5
B	30	60 A	1
C	20	60 B	0.75
D	30	60 C	0.5
E	60	60 D	0.25
F	60	60 E	0.125
G	60	60 F	0.0625
H	60	0	0

注：BSA标品蛋白浓度为  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，所有样品均用去离子水进行稀释。

(2) 将  $5\ \mu\text{L}$ 不同浓度的蛋白标准品和样品分别加入 96 浅孔板中，之后向各孔内加入  $250\ \mu\text{L}$ 的G250 染色液，每组设置三个平行。

(3) 于酶标仪下测量  $595\ \text{nm}$ 下的吸光度，根据吸光值和蛋白浓度绘制蛋白浓度标准曲线并计算蛋白浓度。

#### 2.4.6 T4E酶活力测定

酶活力的测定：将  $200\ \mu\text{L}$ 酶液加入到  $800\ \mu\text{L}$ 含有  $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  D-果糖的HEPPS缓冲液( $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.5,  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Ni}^{2+}$ )中，缓冲液需提前预热，混匀后置于  $70^\circ\text{C}$ 下反应  $30\ \text{min}$ ，之后沸水浴  $10\ \text{min}$ 进行灭酶。

酶活力定义：每分钟内产生  $1\ \mu\text{mol}$  D-塔格糖所用的酶量为一个酶活单位(U)。

#### 2.4.7 T4E酶学性质测定

最适温度的测定：取T4E酶液  $200\ \mu\text{L}$ 加入到  $800\ \mu\text{L}$ 含有  $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  D-果糖的HEPPS缓冲液( $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8.5,  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Ni}^{2+}$ )中，分别于不同温度( $60\text{-}85^\circ\text{C}$ )下反应  $30\ \text{min}$ ，之后沸水浴  $10\ \text{min}$ 进行灭酶。以最高酶活为  $100\%$ ，计算各个温度下的相对酶活。

最适pH的测定：取适量的T4E酶液  $200\ \mu\text{L}$ 加入到  $800\ \mu\text{L}$ 含有  $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  D-果糖的缓冲液( $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.5-9.5,  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Ni}^{2+}$ )中，分别于  $70^\circ\text{C}$ 下反应  $30\ \text{min}$ ，之后沸水浴  $10\ \text{min}$ 进行灭酶。以最高酶活为  $100\%$ ，计算各个pH下的相对酶活。

动力学参数的测定：使用HEPPS缓冲液( $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 7.5-9.5,  $1.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{Ni}^{2+}$ )配制不同浓度的D-果糖溶液( $10$ 、 $20$ 、 $40$ 、 $100$ 、 $200$ 、 $400$ 、 $800$ 、 $1200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )，分别取  $800\ \mu\text{L}$ 于离心管内，提前预热，向其内加入  $200\ \mu\text{L}$ 的T4E酶液，并于最适温度下反应  $30\ \text{min}$ ，反应结束后沸水浴  $10\ \text{min}$ 进行灭酶，样品处理后进行液相检测并计算不同底物浓度下T4E的比活力，根据数据拟合曲线得到 $K_m$ 及 $V_{\text{max}}$ 值，并计算 $k_{\text{cat}}$ 值。

温度稳定性：取一定量的T4E酶液置于最适温度下进行孵育，间隔一定时间取样，按照 2.4.5 的所示方法测定残余酶活，定义反应  $0\ \text{h}$ 时酶活为  $100\%$ ，计算不同样品的相对酶活。

解折叠温度( $T_m$ )的测定: 使用差示扫描微量热仪(Nano-DSC)测量酶分子的解折叠温度( $T_m$ )。首先将样品与缓冲液进行脱气处理, 将样品池使用超纯水清理干净后, 向其内加入缓冲液并反复吹洗使其充满整个样品池, 之后测定3次缓冲液的热力学曲线, 将其作为基线。随后将样品池内的缓冲液吸出, 向其内添加样品并反复多次吹吸, 然后开始测定酶分子的热力学曲线。检测参数: 压力为3个大气压, 温度范围为30°C-110°C, 升温速度为1°C·min<sup>-1</sup>。

#### 2.4.8 D-塔格糖的生物合成

温度优化: 以300 g L<sup>-1</sup> D-果糖为底物, 加酶量为4.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>, 分别于不同温度(60-85°C)下反应5 h, 每隔1 h取样并煮沸10 min灭酶, 样品处理后使用高效液相色谱(HPLC)对产物进行检测并计算转化率。

加酶量优化: 以300 g·L<sup>-1</sup> D-果糖为底物, 加酶量分别为4.5、9、18 mg·mL<sup>-1</sup>, 于70°C下反应5 h, 每隔1 h取样并煮沸10 min灭酶, 样品处理后使用HPLC对产物进行检测并计算转化率。

底物浓度优化: 以浓度为100-800 g·L<sup>-1</sup>的D-果糖为底物, 加酶量为4.5 mg·mL<sup>-1</sup>, 于70°C下反应5 h, 每隔1 h取样并煮沸10 min灭酶, 样品处理后使用HPLC对产物进行检测并计算转化率。

#### 2.4.9 HPLC检测

样品灭酶处理后于12000 r·min<sup>-1</sup>下离心5 min, 将上清取出并稀释至一定浓度, 之后将样品用0.22 μm的滤膜过滤。色谱条件: Agilent 1200 HPLC色谱仪, Agilent Hi-Plex Ca, 300×7.7 mm色谱柱, Agilent示差检测器, Agilent自动进样器, 流动相为纯水, 柱温为80°C, 流速为0.5 mL·min<sup>-1</sup>。

#### 2.4.10 分子动力学模拟

使用AlphaFold2<sup>[72]</sup>软件预测T4E的3D结构, 以ff14SB作为蛋白质力场<sup>[73]</sup>, TIP3P作为水分子力场, 在343 K下用AMBER对T4E野生型及突变体进行分子动力学(Molecular dynamics, MD)模拟, 模拟100 ns, 使用MMPBSA<sup>[74]</sup>对轨道进行分析, 用于计算自由能的变化。

#### 2.4.11 分子对接

使用AlphaFold2<sup>[72]</sup>软件预测T4E的3D结构, 使用Autodock 4.2.软件进行分子对接, 将T4E与其突变体作为受体大分子, 以D-果糖为小分子, 选择合适的结合口袋, 进行对接, 在Pymol中进行可视化分析。

#### 2.4.12 T4E全细胞固定化

固定化细胞的制备: 称取一定质量的海藻酸钠并向其中加入一定量的去离子水, 加热搅拌使其溶解混匀, 待其冷却后加入一定体积的菌悬液, 称取一定质量的硅藻土

加入其中并搅拌混匀，使用带针头的注射器将其缓慢均匀得滴入一定浓度的CaCl<sub>2</sub>溶液中，保证每个固定化微球的大小基本一致，将其置于4℃冰箱中静置3 h进行硬化处理，硬化结束后将CaCl<sub>2</sub>溶液倒出然后用去离子水洗涤固定化微球，重复三次，之后向其中加入一定体积的生理盐水并保存在4℃冰箱中备用。

游离细胞酶活力的测定：称取一定量的菌体加入5 mL D-果糖浓度为50 mmol·L<sup>-1</sup>的HEPPS缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8.5, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>)中，于75℃下反应30 min，反应结束后沸水浴10 min进行灭酶。

固定化细胞酶活力的测定：称取一定量的固定化微球，加入5 mL D-果糖浓度为50 mmol·L<sup>-1</sup>的HEPPS缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 8.5, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>)中，于75℃下反应30 min，反应结束后沸水浴10 min进行灭酶。

固定化细胞酶活回收率(%)：固定化细胞的酶活力与用于固定化的游离细胞的酶活力的比值。

固定化细胞体系的优化：

(1) 海藻酸钠浓度优化：保持细胞包埋量、CaCl<sub>2</sub>浓度、硅藻土浓度不变，控制海藻酸钠浓度分别为：0.5%、1%、2%、3%、4%制备固定化细胞，将制备完成的固定化细胞与同样菌体量的游离细胞按2.4.11所述方法进行酶活力的测定并计算酶活回收率。

(2) 细胞包埋量优化：保持海藻酸钠浓度、CaCl<sub>2</sub>浓度、硅藻土浓度不变，控制细胞包埋浓度分别为：30 g·L<sup>-1</sup>、50 g·L<sup>-1</sup>、75 g·L<sup>-1</sup>、100 g·L<sup>-1</sup>、150 g·L<sup>-1</sup>、200 g·L<sup>-1</sup>制备固定化细胞，并将制备完成的固定化细胞与同样菌体量的游离细胞按2.4.11所述方法进行酶活力的测定并计算酶活回收率。

(3) CaCl<sub>2</sub>浓度优化：保持海藻酸钠浓度、细胞包埋量、硅藻土浓度不变，分别在CaCl<sub>2</sub>浓度为：0.5%、1%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%下制备固定化细胞，将制备完成的固定化细胞与同样菌体量的游离细胞按2.4.11所述方法进行酶活力的测定并计算酶活回收率。

(4) 硅藻土浓度优化：保持海藻酸钠浓度、细胞包埋量、CaCl<sub>2</sub>浓度不变，分别在硅藻土浓度为：0、0.5%、1%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%下制备固定化细胞，将制备完成的固定化细胞与同样菌体量的游离细胞按2.4.11所述方法进行酶活力的测定并计算酶活回收率。

海藻酸钠浓度、细胞包埋浓度、CaCl<sub>2</sub>浓度、硅藻土浓度均为质量浓度(w·v<sup>-1</sup>, %)。

### 2.4.13 固定化细胞酶学性质测定

按2.4.10优化后的条件制备固定化细胞，按2.4.10所示方法测定游离细胞和固定化细胞的酶活。

固定化细胞最适pH的测定：配制D-果糖浓度为50 mmol·L<sup>-1</sup>的缓冲液(pH 7.0-9.5, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>)，称取2 g固定化微球，按固定化细胞酶活力的测定方法于不同pH的缓冲体系中测定固定化细胞的酶活力。以最高酶活力为100%，计算不同pH下的相对酶

活，确定固定化细胞的最适pH。

固定化细胞最适温度的测定：在最适pH条件下，称取 2 g 固定化微球，按固定化细胞酶活力的测定方法分别于不同温度下(60-85°C)测定固定化细胞的酶活力。以最高酶活力为 100%，计算不同温度下的相对酶活，确定固定化细胞的最适温度。

#### 2.4.14 固定化细胞的应用

将一定质量的游离细胞与同样菌体量(细胞终浓度为  $75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )制备的固定化微球加入 10 mL D-果糖浓度为  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的反应体系内(pH 8.5,  $1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ )，分别于  $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，70°C、75°C下反应 4 h，反应结束后取样并于沸水浴 10 min进行灭酶，之后用去离子水清洗固定化微球三次，向固定化微球中重新加入底物后继续进行下一批次的反应，连续进行多批次反应直至无产物产生。



## 第三章 结果与讨论

### 3.1 T4E在大肠杆菌中的重组表达及全细胞固定化研究

大肠杆菌作为最常用的重组蛋白异源表达宿主，具有众多优势，因此本研究选择将T4E在大肠杆菌中进行重组表达，并对其酶学性质进行测定与酶转化体系优化。鉴于T4E的比活力较低，热稳定性较差，而全细胞固定化能够在一定程度上提升酶分子的稳定性、更易与产物分离、可多次重复利用，能够满足工业化需求，且细胞固定化技术具有操作简单、分离纯化方便、成本低等优势。因此使用全细胞进行固定化，以提升T4E在高温下反应的稳定性和多批次反应能力。本研究使用吸附-包埋法(硅藻土-海藻酸钠)进行全细胞固定化并对固定化条件进行优化(海藻酸钠浓度、细胞包埋量、CaCl<sub>2</sub>浓度、硅藻土浓度)，在最优条件下对固定化细胞的应用效果进行探究。

#### 3.1.1 T4E表达与纯化

将重组菌进行摇瓶发酵，通过SDS-PAGE分析T4E的表达情况。SDS-PAGE结果如图 3-1 (a)所示，在破壁上清与破壁沉淀中均未观察到明显的目的蛋白条带，表明T4E未能成功表达。

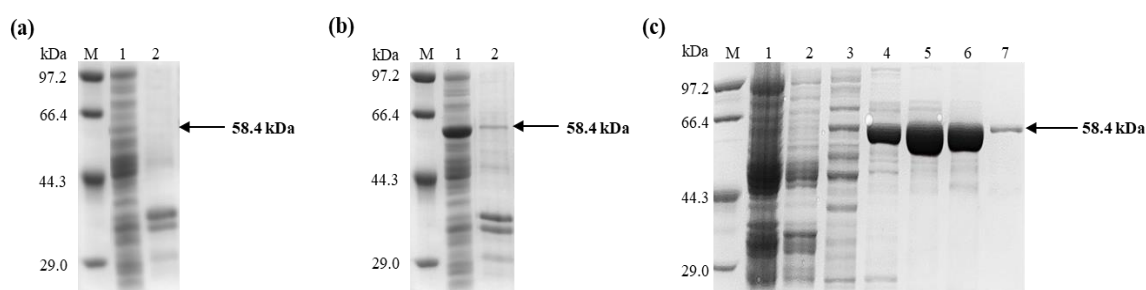


图 3-1 T4E的表达与纯化

- (a) T4E的表达；(b) 融合T7 tag的T4E的表达；(c) T4E的纯化  
 (a) 泳道M: 蛋白分子量标准；泳道 1: 破壁上清；泳道 2: 破壁沉淀；  
 (b) 泳道M: 蛋白分子量标准；泳道 1: 破壁上清；泳道 2 破壁沉淀；  
 (c) 泳道M: 蛋白分子量标准；泳道 1-7: 不同咪唑浓度的洗脱液；

Fig. 3-1 The expression and purification of T4E

- (a) The expression of T4E; (b) The expression of T4E fused with T7 tag ; (c) Purification of T4E  
 (a): Lane M: standard protein marker; lane1: Cell lysate; lane2: Cell pellet;  
 (b): Lane M: standard protein marker; lane1: Cell lysate; lane2: Cell pellet ;  
 (c): Lane M: standard protein marker; Lane 1-7: eluents of different imidazole concentrations

T7 tag由T7噬菌体基因的前导序列编码的11个氨基酸组成，是一种常用的多肽标签，其氨基酸序列为：MASMTGGQQMG。分别以T7-F/R为上下游引物，以pET-24a(+)-*t4e*质粒为模板，将T7 tag添加至T4E N端，构建重组质粒pET-24a(+)-*t7-t4e*，如图 3-2 所示，测序验证正确后，将重组质粒转化至表达宿主*E. coli* BL21 (DE3)，进行重组菌摇瓶发酵。T4E的N端融合T7 tag后，其表达结果如图 3-1 (b)所示，在破壁上清中可

观察到明显的目的蛋白条带，在破壁沉淀中也可观察到目的蛋白条带，且条带大小与T4E的理论分子量(58.4 kDa)基本一致，结果表明，T7 tag的融合成功实现了T4E在大肠杆菌中的重组表达。

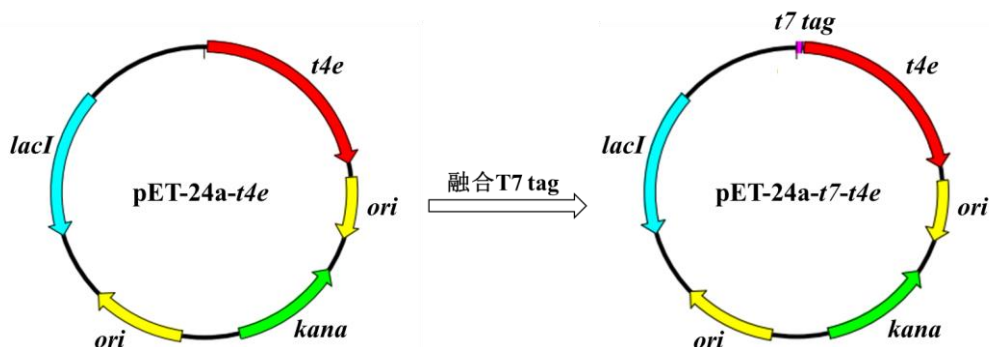


图 3-2 pET-24a-t7-t4e的构建

Fig. 3-2 The construction of pET-24a-t7-t4e

使用RNAfold对T4E的N端mRNA二级结构进行预测，结果如图 3-3 所示，当在T4E的N端融合T7 tag后，其mRNA发卡结构减少，推测其可能促进了核糖体在mRNA上的移动，进而提升了mRNA的翻译速率<sup>[33]</sup>，促进了T4E的重组表达。

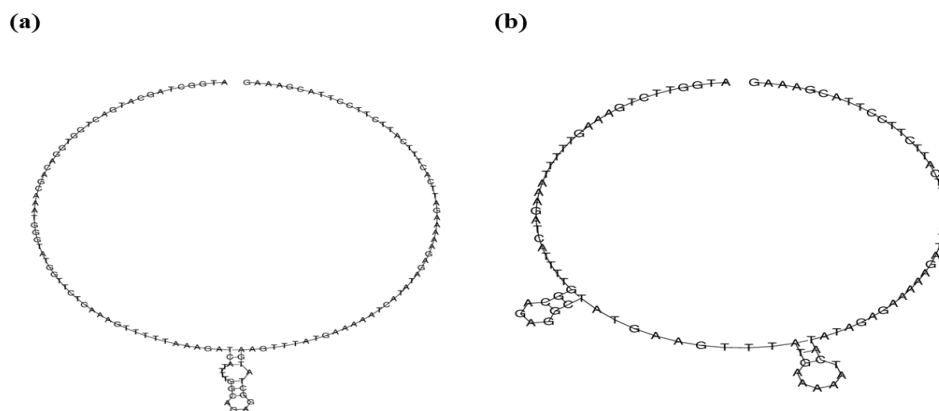


图 3-3 重组质粒mRNA二级结构

(a) 质粒pET-24a-t7-t4e; (b) 质粒pET-24a-t4e

Fig. 3-3 Secondary structure of recombinant plasmid mRNA

(a) The plasmid pET-24a-t7-t4e; (b) The plasmid pET-24a-t4e

将重组表达后的T4E使用镍柱进行纯化，经柱平衡、挂柱、流穿、洗脱以及超滤等步骤后，获得纯化的T4E。将纯化后的T4E进行SDS-PAGE分析，其结果如图 3-1 (c)所示，当咪唑浓度为  $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  时(泳道：7)，纯化条带清晰单一且大小与T4E理论分子量(58.4 kDa)一致，说明T4E纯化成功且纯化效果较好，经测定T4E的比活力为  $0.14 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

### 3.1.2 T4E酶学性质测定

#### 3.1.3.1 T4E的最适pH与最适温度

为探究pH对T4E酶活力的影响，测定了野生型T4E在不同pH (7.0-9.5)的缓冲体系下的酶活力。结果如图 3-4 (a)所示，T4E在弱碱性环境中的酶活高于中性环境，在pH为

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/828046137024006042>