

枯草芽孢杆菌产 *D*-阿洛酮糖 3-差向异构酶的发酵优化

卜一凡¹, 张涛^{1,2}, 陈静静^{1,2}, 江波^{*1,2}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品安全国际联合实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: *D*-阿洛酮糖是 *D*-果糖在 C-3 位的差向异构体, 由于较低的热量和与蔗糖相似的甜度, *D*-阿洛酮糖成为一个具有发展前景的功能性甜味剂。*D*-阿洛酮糖 3-差向异构酶(*D*-psicose 3-epimerase, EC 5.1.3.30, DPEase)能够催化 *D*-果糖生产 *D*-阿洛酮糖, 这种生物酶法制备的功能性甜味剂 *D*-阿洛酮糖由于简单的纯化步骤和高产物浓度等优点受到关注。该研究对 1 株前期构建的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 1A751/pUB-P43dpe-dal 产 DPEase 进行了 3 L 发酵罐水平培养, 通过优化溶解氧(DO)、pH、温度、初始碳源质量浓度确定最适发酵条件为: DO 为 30%、pH 6.0、温度 37 °C、初始葡萄糖质量浓度 15 g/L, 最高发酵酶活达 78.3 U/mL。在此基础上进行补料发酵优化, 得到最适补料条件为: 在发酵 5 h 进行补料, 碳源补料速率 8.0 g/(L·h), 在此条件下, 发酵 9 h 全细胞酶活高达 123.0 U/mL。此发酵策略为扩大工业化生产提供了参考。

关键词: *D*-阿洛酮糖; *D*-阿洛酮糖 3-差向异构酶; 枯草芽孢杆菌; 发酵优化; 酶活

中图分类号: TS 241 文章编号: 1673-1689(2022)05-0074-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.05.009

Fermentation Optimization of *D*-Psicose 3-Epimerase Produced by *Bacillus subtilis*

BU Yifan¹, ZHANG Tao^{1,2}, CHEN Jingjing^{1,2}, JIANG Bo^{*1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: *D*-allulose is a C-3 epimer of *D*-fructose. It has similar sweetness to sucrose but provides significantly lower calorie, which makes it a functional sweetener with important application potentials. The enzymatic preparation of *D*-allulose from *D*-fructose catalyzed by *D*-psicose 3-epimerase (EC 5.1.3.30, DPEase) has attracted much attention owing to its simple purification process and high product concentration. To obtain higher expression of enzyme, DPEase was produced by a previously constructed strain, *Bacillus subtilis* 1A751/pUB-P43dpe-dal, in a 3 L fermentor. By optimizing the dissolved oxygen (DO), pH, temperature and initial carbon source concentration, the optimal fermentation conditions were determined as follows: DO 30%, pH 6.0, 37 °C, initial glucose concentration of 15 g/L. And the maximum enzyme activity reached 78.3 U/mL. On this basis, the fed-batch fermentation was applied, and the optimal fed fermentation time was 5 h.

收稿日期: 2021-03-10

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2020B020226007)。

*通信作者: 江波(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品化学和应用酶技术方面的研究。E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

At a constant feeding rate of 8.0 g/(L·h), the whole-cell enzyme activity reached 123.0 U/mL after 9 h fermentation. This strategy of fermentation could provide a theoretical basis for the expanding the industrial production of D-allulose.

Keywords: D-allulose, D-psicose 3-epimerase, *Bacillus subtilis*, fermentation optimization, enzyme activity

D-阿洛酮糖分子式为 $C_6H_{12}O_6$, 是一种稀有糖。由于具有较低的热量但却有蔗糖 70% 的甜度, 它为糖尿病人和肥胖人群提供了传统糖制品的替代品, 因此, D-阿洛酮糖备受关注^[1]。D-阿洛酮糖在自然界中少量地存在于甘蔗、小麦等植物中^[2-3]; 化学合成法制备 D-阿洛酮糖由于较多的副产物、复杂的纯化步骤而受到限制^[4]; 而通过 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (D-psicose 3-epimerase, EC 5.1.3.30, DPEase) 催化 D-果糖生产 D-阿洛酮糖有许多优势, 例如简单的纯化过程和较高的产物浓度等^[5]。枯草芽孢杆菌是一种食品级微生物, 非致病性, 且拥有高效分泌蛋白质的能力^[6], 常用在抗生素、酶制剂的制备中。本研究所用的 *Bacillus subtilis* 1A751/pUB-P43dpe-dal^[1] 为作者所在实验室前期构建的具有双启动子、无抗生素抗性的基因重组枯草芽孢杆菌, 在前期实验中, 其在 Super-Rich 培养基中的最高发酵酶活为 6 U/mL。

该研究目的是利用此基因重组菌 *Bacillus subtilis* 1A751/pUB-P43dpe-da 在 3 L 发酵罐水平上进行产 DPEase 的发酵优化, 获得最适培养条件后进行补料培养来提高酶蛋白质表达量, 以期工业化制备 D-阿洛酮糖提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 生产菌株 基因重组菌 *Bacillus subtilis* 1A751/pUB-P43dpe-dal 为作者所在实验室前期构建保藏^[1]。

1.1.2 培养基

1) 固体平板培养基 (组分 g/L) NaCl 10.0、蛋白胨 10.0、酵母膏 5.0、琼脂粉 20.0; 调节 pH 7.0。

2) 种子液体培养基 (组分 g/L) NaCl 10.0、蛋白胨 10.0、酵母膏 5.0; 调节 pH 7.0。

3) 发酵培养基 (组分 g/L) 葡萄糖 15.0、酵母膏 20.0、蛋白胨 10.0、NaCl 8.0、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1.0。

1.1.3 主要试剂及仪器 葡萄糖、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、NaCl、琼脂粉、 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、氨水、盐酸: 购自国药集团; 果糖: 购自上海生工生物工程有限公司; 酵母膏、蛋白胨: 购自北京奥博星生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

Waters e2695 高效液相色谱: 美国 Waters 公司产品; DASGIP 四联 3 L 发酵罐: 德国 Eppendorf 公司产品; MiniSpin 离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; DK-8D 电热恒温水浴锅: 上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品; A360 紫外可见分光光度计: 北京普析通用仪器有限责任公司产品。

1.2 培养方法

1.2.1 菌种活化与发酵罐培养 接种环蘸取甘油管保藏的菌种, 平板固体培养基划线, 37 °C 培养 12 h。挑取单菌落转接入液体培养基中 (装液体积分数 10%), 37 °C、200 r/min 培养 12~14 h。将种子液按体积分数 3% 转接入已含发酵培养基的 3 L 发酵罐中。将搅拌速率、通气量关联溶氧值, 以搅拌速率 1 000 r/min、通气量 2 vvm 调节溶氧值为 100%。发酵过程中定时取样测定 OD_{600} 、酶活、葡萄糖质量浓度。

1.2.2 发酵指标测定

1) 菌体生长量的测定 调节分光光度计波长为 600 nm, 将所得的发酵液样品稀释至适宜的浓度, 置于比色皿中读数, 记录吸光值。

2) DPEase 酶活的测定 取发酵液样品 1 mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 沉淀用磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 反复洗吹、离心 3 次, 将菌体沉淀稀释至合适的浓度后, 加到终体积 1 mL 用磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.5) 配制的果糖底物溶液中 (果糖质量浓度 90 g/L, Mn^{2+} 浓度为 1 mmol/L), 55 °C 保温反应 10 min, 煮沸灭酶 5 min 后于 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 制样, HPLC 分析。酶活定义: 在 55 °C、pH 7.5 条件下, 每分钟内催化合成 1 μmol 的 D-阿洛酮糖所需的酶量为一个酶活单位 (U)。

3) 葡萄糖质量浓度的测定 取发酵液样品 1

mL, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液稀释至合适的浓度后过 0.22 μm 滤膜, 制样, HPLC 分析。

1.2.3 溶解氧(DO)对发酵的影响 在发酵过程中, 分别控制 DO 为 20%、30%, 在初始碳源质量浓度为 15 g/L、pH 自然、37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行发酵, 定时取样测定 OD_{600} 值、酶活及葡萄糖质量浓度。

1.2.4 pH 对发酵的影响 在发酵过程中通过流加 14% 氨水和 13% 盐酸控制 pH, 分别控制 pH 在 6.0、7.0 及自然; 通过流加体积分数 14% 氨水控制 pH $\geq$ 6.0, 在初始碳源质量浓度为 15 g/L、温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、DO 为 30% 条件下进行发酵, 定时取样测定 OD_{600} 、酶活及葡萄糖质量浓度。

1.2.5 温度对发酵的影响 分别控制温度 28、37、42 $^{\circ}\text{C}$, 在初始碳源质量浓度 15 g/L、pH 6.0、DO 为 30% 条件下进行发酵, 定时取样测定 OD_{600} 值、酶活及葡萄糖质量浓度。

1.2.6 初始碳源质量浓度对发酵的影响 设置发酵培养基中初始葡萄糖质量浓度分别为 15、20、25 g/L, 在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 6.0、DO 为 30% 条件下进行发酵, 定时取样测定 OD_{600} 值、酶活及葡萄糖质量浓度。

1.2.7 补料时机对发酵的影响 在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、初始碳源质量浓度 15 g/L、pH 6.0、DO 为 30% 条件下进行发酵, 分别在第 4、5、6、7 小时进行补料, 流量 30 mL/h, 补料瓶成分为 540 g/L 葡萄糖+20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 即碳源补料速率为 16 g/(L $\cdot$ h), 定时取样测定 OD_{600} 值、酶活及葡萄糖质量浓度。

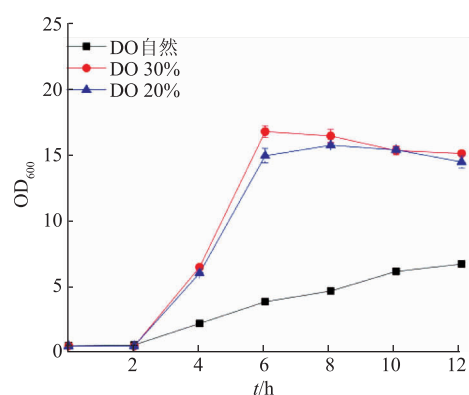
1.2.8 补料碳源速率对发酵的影响 在温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 、初始碳源质量浓度 15 g/L、pH 6.0、DO 为 30% 条件下进行发酵, 第 5 小时进行补料, 流量 30 mL/h。补料瓶成分分别为 135 g/L 葡萄糖+20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、270 g/L 葡萄糖+20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、400 g/L 葡萄糖+20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、540 g/L 葡萄糖+20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 即碳源补料速率分别为 4、8、12、16 g/(L $\cdot$ h), 定时取样测定 OD_{600} 值、酶活及葡萄糖质量浓度。

2 结果与分析

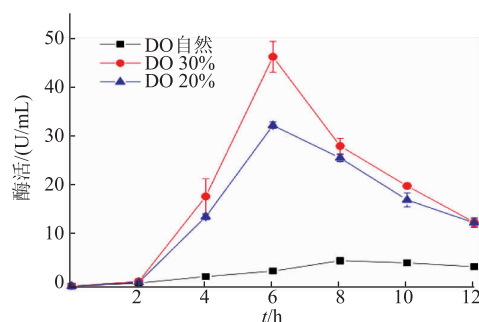
2.1 DO 对发酵的影响

有研究表明, DO 值较低时影响菌体代谢, 而过高的 DO 值虽然可以使菌体迅速生长, 但是容易导致菌体衰老, 产量下降^[7-9]。枯草芽孢杆菌是好氧菌,

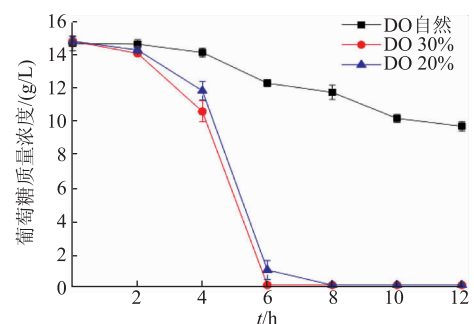
控制发酵过程中的 DO 值对于菌体发酵和产酶具有重要作用^[10]。图 1 显示了 DO 值分别为 20%、30% 和 DO 自然时对发酵的影响。可以看出, 未控制体系 DO 时, OD_{600} 值增长缓慢, 菌体生长受限, 同样也不利于产酶。而 DO 值为 20% 和 30% 的情况下, 菌体得以生长并且产酶量增高。DO 为 30% 时, 酶活最高, 因此选择 DO 为 30% 作为最适 DO 条件。



(a) DO 对菌体生长量的影响



(b) DO 对酶活的影响



(c) DO 对葡萄糖消耗的影响

图 1 DO 对发酵的影响

Fig. 1 Effect of DO on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

2.2 pH 对发酵的影响

pH 可以影响菌体细胞膜的通透性和代谢, 进而影响发酵进程^[11-12]。分别控制发酵 pH 为 6.0、7.0、

pH 自然和 $\text{pH} \geq 6.0$, 结果见图 2。在 pH 6.0 和自然的条件下, 菌体增长较为缓慢, 但在 pH 6.0 条件下 6 h 达到最高酶活, 为 78.3 U/mL。在 pH 7.0 条件下, 菌体量达到最大后骤降, 可能是由于流加的盐酸、氨水量破坏了菌体。在维持 $\text{pH} \geq 6.0$ 的条件下, 碳源耗尽之后 pH 开始增加, 发酵罐系统停止补充氨水, 体系体积不再增长, 使得测试的菌体量和酶活都出现了“二次增长”的现象。重组菌在 4 种 pH 控制条件下达到的最高酶活分别为 78.3、62.3、46.3、42.4 U/mL, 所以选择 pH 6.0 作为最优的发酵 pH。

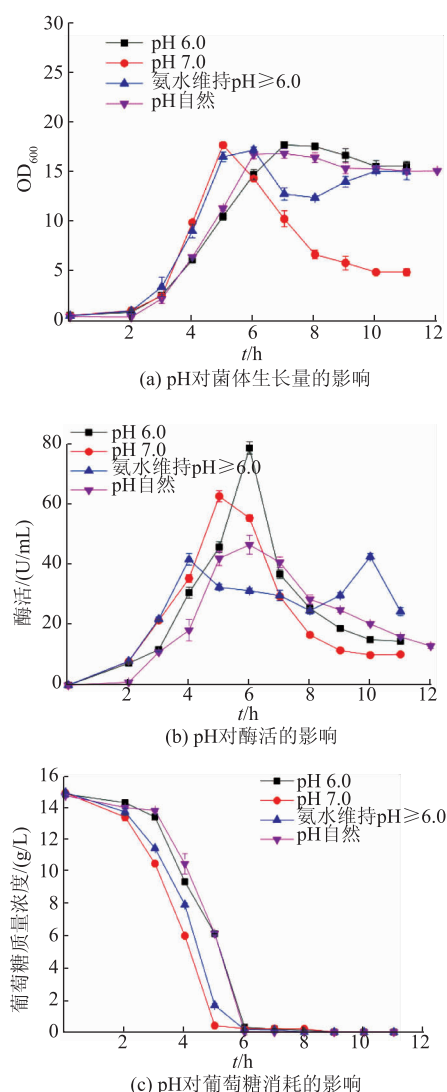


图 2 pH 对发酵的影响

Fig. 2 Effect of pH on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

2.3 温度对发酵的影响

分别设置 28、37、42 °C 以研究温度对重组菌发酵过程的影响, 结果见图 3。随着温度的升高, 菌体的生长、酶活的升高、葡萄糖消耗速度都随之加快。最高酶活出现在 37 °C 的实验组, 温度过高、过低都不适合菌体发酵, 温度过高会导致重组蛋白质的折叠紊乱进而形成包涵体^[13], 长时间的高温也会导致酶的失活。而较低的温度使得菌体生长、产酶速度过慢。因此, 选择 37 °C 为最佳的发酵温度。

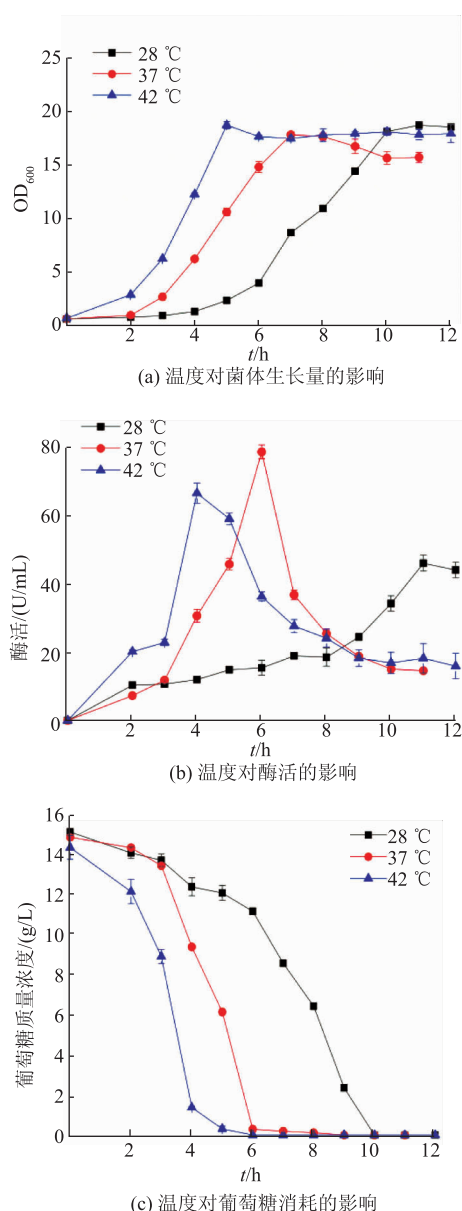


图 3 温度对发酵的影响

Fig. 3 Effect of temperature on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

2.4 初始碳源质量浓度对发酵的影响

碳源对菌体发酵和产酶具有重要作用,是需求量最大的营养要素^[14]。在确定最佳 DO、pH 和温度后,分别设置发酵培养基中 15、20、25 g/L 的初始葡萄糖质量浓度。当初始葡萄糖质量浓度为 15 g/L 时,菌体生长和产酶较快,而质量浓度为 25 g/L 时,最高酶活仅为 53.4 U/mL,但菌体增长情况与 20 g/L 的实验组相似,见图 4。当培养基中碳源质量浓度过高时,菌体由于脱水而菌体量下降^[15],并且 CcpA 蛋白的产生会抑制酶蛋白的转录翻译,酶活下降^[15-18]。综上,确定发酵培养基最适的初始葡萄糖质量浓度为 15 g/L。

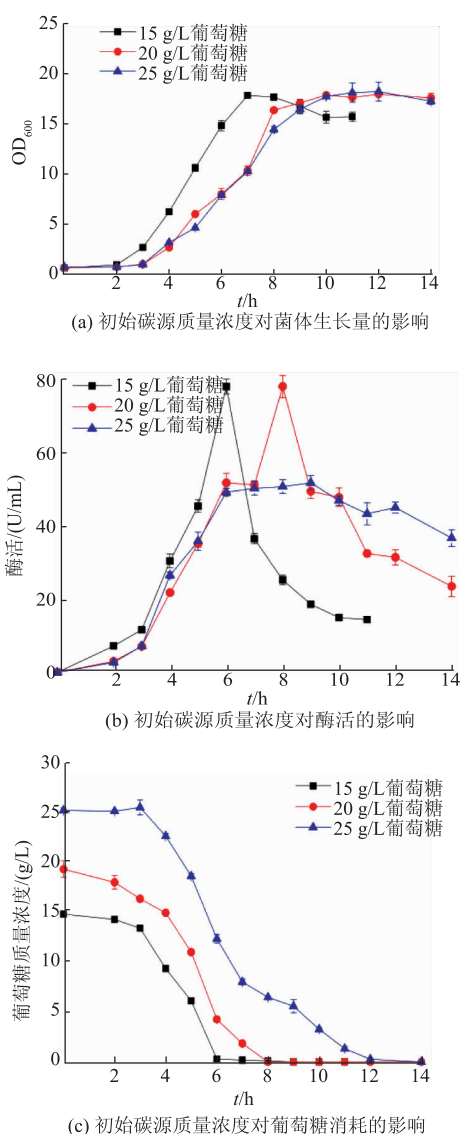


图 4 初始碳源质量浓度对发酵的影响

Fig. 4 Effect of initial carbon source concentration on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

2.5 补料时机对发酵的影响

在确定初始培养条件后,对发酵体系进行补料,其中葡萄糖和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 补料速率分别为 16、0.6 g/(L·h),基于此条件对补料起始时间(4、5、6、7 h)进行了优化。由图 5 可知,在发酵的第 4、5、6、7 小时分别对应发酵罐中葡萄糖的残余质量浓度为 10、4、0、0 g/L。3 种补料方式中,从 7 h 起开始补料的实验组结果较不明显,这是由于补料时间太迟,菌体发酵过程中不利产物的积累一定程度上影响了菌体对补料的吸收。

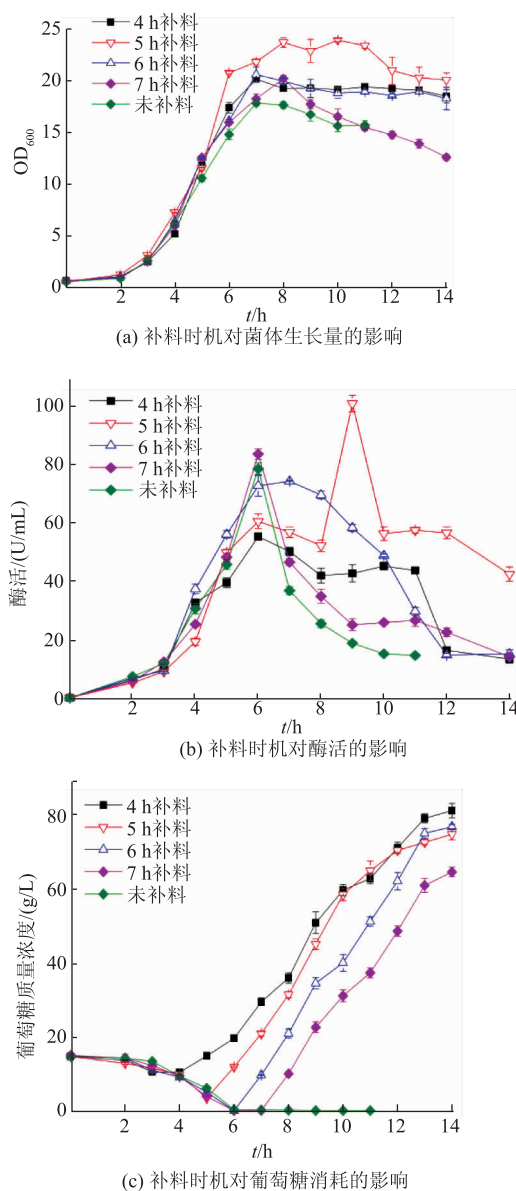


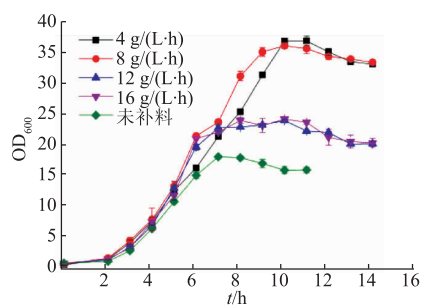
图 5 补料时机对发酵的影响

Fig. 5 Effect of feeding time on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

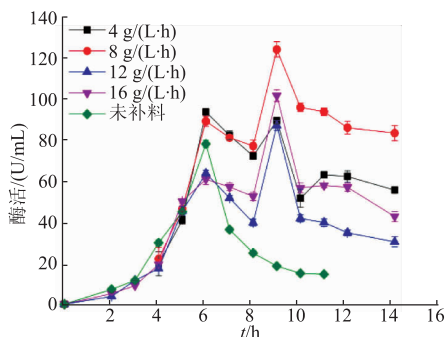
当起始补料时间为4、6 h时,最高酶活仅为55.1、74.1 U/mL,低于未补料的酶活78.3 U/mL。而在第5小时开始补料,不仅在发酵过程中获得了最高的酶活,且在后期酶活能够维持在较高位,因此,较好的补料起始时间为第5小时。

2.6 补料碳源速率对发酵的影响

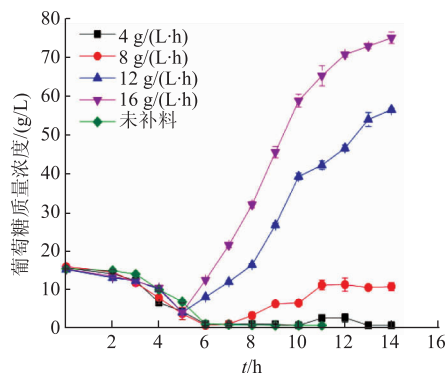
基于上述结果,较佳的补料时间为第5小时,分别设置葡萄糖补料速率4、8、12、16 g/(L·h),其中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为0.6 g/(L·h)。如图6(a),补料之后的菌体量均上升,最高 OD_{600} 值由17.8上升至36.8。如图6(b),补料组的酶活出现了“双峰”的趋势,这是由于补料的结果。当补料速率为12、16 g/(L·h)时,第6小时的酶活低于未补料的对照组,考虑到图6(a)中6 h菌体量显著高于对照组,说明此时酶活的降低可能并不是因为补料的稀释作用,而是因为此速率补料对补料后1 h内的酶活产生一定的抑制作用。这两种补料速率在中后期出现了葡萄糖的不断积累,导致酶活低于补料速率为4、8 g/(L·h)的实验组。而补料速率为4 g/(L·h)时,后期酶活也降至较低水平,结合图6(c)中其葡萄糖质量浓度变化,推测酶活降低的原因为4 g/(L·h)补料速率不能满足菌体对葡萄糖的需求,体系中葡萄糖耗尽未得到及时补充。当补料速率为8 g/(L·h)时,菌体在9 h达到最高酶活123.0 U/mL,并且酶活能够长时间保持高位,因此选择8 g/(L·h)的补料速率。



(a) 碳源补料速率对菌体生长量的影响



(b) 碳源补料速率对酶活的影响



(c) 碳源补料速率对葡萄糖消耗的影响

图6 碳源补料速率对发酵的影响

Fig. 6 Effect of feeding rate on cell growth, enzyme activity and glucose consumption during fermentation

3 结语

在对DO、pH、温度、初始葡萄糖质量浓度进行优化后,确定了最适条件为:DO 30%,pH 6.0,温度37℃、初始葡萄糖质量浓度15 g/L。该发酵条件下酶活为78.3 U/mL。在此基础上进行补料培养,最适补料条件为:在发酵第5小时分别以8 g/(L·h)和0.6 g/(L·h)的速率流加葡萄糖与 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,在发酵第9小时达最高酶活,为123.0 U/mL,是优化前产酶能力的24倍。CHEN等^[19]、FU等^[20]通过枯草芽孢杆菌在7.5 L发酵罐中补料生产DPEase,获得酶活分别为95 U/mL(84 h)、74 U/mL(72 h),发酵周期较长导致耗时和成本增加。而该研究中的发酵方法为工业化生产D-阿洛酮糖奠定了基础,后续可对分段控制pH和DO值等进一步优化。

参考文献:

- [1] HE W, MU W, JIANG B, et al. Construction of a food grade recombinant *Bacillus subtilis* based on replicative plasmids with an auxotrophic marker for biotransformation of *D*-Fructose to *D*-Allulose[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016, 64(16):3243-3250.
- [2] OSHIMA H, KIMURA I, IZUMORI K. Psicose contents in various food products and its origin[J]. **Food Science and Technology Research**, 2006, 12(2):137-143.
- [3] JIA M, MU W, CHU F, et al. A *D*-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium bolteae* for *D*-psicose production: cloning, expression, purification, and characterization[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(2):717-725.
- [4] ZHENG L, SUN Y, WANG J, et al. Preparation of a flower-like immobilized *D*-psicose 3-epimerase with enhanced catalytic performance[J]. **Catalysts**, 2018, 8(10):468.
- [5] IZUMORI K. Izumoring: A strategy for bioproduction of all hexoses[J]. **Journal of Biotechnology**, 2006, 124(4):717-722.
- [6] ZHU Y, LIU Y, LI J, et al. An optimal glucose feeding strategy integrated with step-wise regulation of the dissolved oxygen level improves N-acetylglucosamine production in recombinant *Bacillus subtilis*[J]. **Bioresource Technology**, 2015, 177:387-392.
- [7] ZDAMAR T H. Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: use of citric acid as the carbon source[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1998, 23(7-8):451-461.
- [8] LI Y, HUGENHOLTZ J, CHEN J, et al. Enhancement of pyruvate production by *Torulopsis glabrata* using a two-stage oxygen supply control strategy[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2002, 60(1-2):101-106.
- [9] 王恒伟, 陈长华, 付水林, 等. 腺苷发酵液中有机的代谢规律[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2004, 24(2):223-226.
- [10] 刘剑, 徐达. 溶解氧控制对枯草芽孢杆菌发酵生产腺苷的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7):86-89.
- [11] 张大伟, 刘德华, 黄钦钦, 等. 食品级高产亮氨酸氨肽酶重组 *Bacillus subtilis* 的构建和发酵优化[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(8):1-6.
- [12] XI H, TIAN Y, ZHOU N, et al. Characterization of an N-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2015, 55(2):236-246.
- [13] 孙帆. 解纤维梭菌 *D*-阿洛酮糖 3-差向异构酶在枯草芽孢杆菌中的重组表达、应用及固定化研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [14] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [15] 李洪康, 李由然, 李赢, 等. 枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(5):102-107.
- [16] 由德林. 酶工程原理[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [17] CHRISTOPH J, WOLFGANG H. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria?[J]. **Molecular Microbiology**, 1995, 15(3):395-401.
- [18] SU L, SUN F, LIU Z, et al. Highly efficient production of *Clostridium cellulolyticum* H10 *D*-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* and use of these cells to produce *D*-psicose[J]. **Microbial Cell Factories**, 2018, 17(188):2-10.
- [19] CHEN J, ZHU Y, FU G, et al. High-level intra- and extra-cellular production of *D*-psicose 3-epimerase via a modified xylose-inducible expression system in *Bacillus subtilis* [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2016, 43(11):1577-1591.
- [20] FU G, ZHANG S, DONG H, et al. Enhanced production of *D*-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* by regulation of segmented fermentation[J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2020, 67(5):812-818.