



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113201565 A

(43) 申请公布日 2021.08.03

(21) 申请号 202110606624.8

C12R 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.27

(71) 申请人 中国科学院广州能源研究所
地址 510640 广东省广州市天河区五山能源路2号

(72) 发明人 陈小燕 余强 张宇 袁振宏
王忠铭

(74) 专利代理机构 广州科粤专利商标代理有限公司 44001

代理人 朱双 莫瑶江

(51) Int. Cl.

C12P 19/24 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

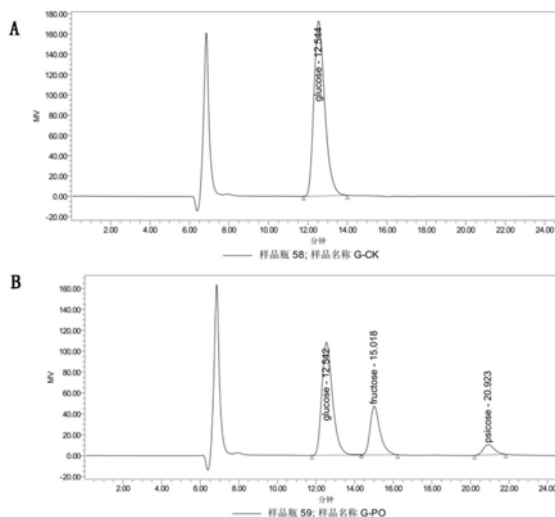
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法。本发明提供了一种以表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA全细胞为催化剂催化D-葡萄糖制备D-阿洛酮糖的方法,并辅以含有氯化胆碱为组成之一、以甘油、尿素、乙二醇为第二组成部分的低共熔溶剂/磷酸缓冲液体系,大大提高了D-阿洛酮糖得率。本发明的利用低共熔溶剂的方法对提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率具有重要的应用价值。



1. 一种基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法,其特征在于,包括以下步骤:将低共熔溶剂与相应缓冲液混合作为催化体系,加入表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株作为催化剂,催化转化D-葡萄糖为D-阿洛酮糖。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的低共熔溶剂为氯化胆碱/甘油、氯化胆碱/尿素、氯化胆碱/乙二醇、氯化胆碱/木糖、氯化胆碱/乙酰胺、氯化胆碱/乙醇和氯化胆碱/咪唑中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的低共熔溶剂是通过如下方法制备得到的:将氯化胆碱和氢键供体以物质的量比1:2-2:1混合放入高温反应釜,于80°C-90°C搅拌均匀至形成均一透明的液体,冷却至室温后取出,制备得到低共熔溶剂。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的缓冲液为磷酸钠盐缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液或柠檬酸盐缓冲液,pH 7.0-9.0。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的低共熔溶剂与缓冲液混合的体积比为1-40:100。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的催化转化反应条件为:30°C-60°C、pH7.0-9.0,反应时间2-48h。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的宿主菌株为大肠杆菌、酵母菌、谷氨酸棒状杆菌、芽孢杆菌或乳酸杆菌。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的宿主菌株为大肠杆菌BL21 (DE3)。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株为经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的加入量为10-200mg细胞湿重/mL反应体系,D-葡萄糖底物浓度为10-200g/L。

一种基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物催化技术领域,具体涉及一种基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法。

背景技术

[0002] 稀有糖是指在自然界存在但含量极少的一类单糖及其衍生物,其在膳食、保健、医药等领域中具有重要的潜在应用价值。D-阿洛酮糖,为果糖C-3异构体,是一类重要的稀有糖,其甜度是蔗糖的70%,而热量仅为后者的0.3%,是蔗糖的良好替代品。动物实验证明D-阿洛酮糖具有独特的营养学和生理学功能,包括1)能降低血糖,可作为II型糖尿病人的辅助治疗剂、膳食补充剂和甜味剂;2)能降低血脂,减少脂肪合成酶活性,抑制腹腔内脂肪堆积等。D-阿洛酮糖具有独特的营养学和生理学功能,2011年被美国食品及药品管理局(FDA)批准为GRAS(一般认为安全,Generally Recognized as Safe)食品,允许应用于医药制剂、食品、膳食补充剂等领域,具有广阔的开发前景及优良的应用价值。

[0003] 生物法催化制备D-阿洛酮糖具有反应条件温和、能耗低、选择性高等优点。DPE可催化D-果糖与D-阿洛酮糖的C3位羟基的差向异构反应,目前常被用于D-果糖为底物制备D-阿洛酮糖。已在多个微生物细胞,包括*Rhodobacter sphaeroides* SK011、*Clostridium cellulolyticum* H10、*Ruminococcus* sp.、*Clostridium scindens*、*Desmospora* sp.、*Dorea* sp. CAG317、*Treponema primitia*、*Arthrobacter globiformis* M30与*Paenibacillus senegalensis*等中发现DPE编码基因的存在,研究人员通过PCR方法克隆得到这些基因序列并将其在表达宿主中获得进行异源表达,以获得含有DPE重组蛋白的全细胞作用生物催化剂,用于催化D-果糖转化D-阿洛酮糖的制备。在该反应的前端加上XYLA催化以D-葡萄糖底物异构化为D-果糖的反应,形成双酶级联反应,并以更为常见的D-葡萄糖为底物制备D-阿洛酮糖,对于稀有糖的低成本制备提供一条可行性路径。

[0004] 含有重组蛋白的全细胞催化制备D-阿洛酮糖的过程具有操作简单、成本低等优点,然而,重组蛋白DPE与XYLA的细胞内表达涉及到底物主动运输过程,会导致催化剂与底物的接触延迟,此外,细胞优先利用D-葡萄糖底物进行生理代谢,导致底物损失与转化效率降低。加快细胞内的酶蛋白与D-葡萄糖的识别,将对促进全细胞催化反应效率具有重要的意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于在全细胞制备D-阿洛酮糖的催化体系中加入一定量低共熔溶剂,达到提高全细胞催化效率、提高D-葡萄糖的转化率,从而降低D-阿洛酮糖生产成本。低共熔溶剂是一类制备简单便宜、毒性低、溶解性好、环保安全的绿色溶剂,在催化领域具有巨大的应用潜力。

[0006] 本发明的基于低共熔溶剂提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率的方法,包括以下

步骤:

[0007] 将低共熔溶剂与相应缓冲液混合作为催化体系,加入表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株作为催化剂,催化转化D-葡萄糖为D-阿洛酮糖。

[0008] 优选,所述的低共熔溶剂为氯化胆碱/甘油、氯化胆碱/尿素、氯化胆碱/乙二醇、氯化胆碱/木糖、氯化胆碱/乙酰胺、氯化胆碱/乙醇和氯化胆碱/咪唑中的至少一种。

[0009] 优选,所述的低共熔溶剂是通过如下方法制备得到的:将氯化胆碱和氢键供体以物质的量比1:2-2:1混合放入高温反应釜,于80℃-90℃搅拌混匀至形成均一透明的液体,冷却至室温后取出,制备得到低共熔溶剂。其中氢键受体是氯化胆碱,氢键供体是中性或弱碱性醇类、弱碱性物质,包括但不限于甘油、尿素、乙二醇。

[0010] 优选,所述的缓冲液为磷酸钠盐缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液或柠檬酸盐缓冲液,pH7.0-9.0。

[0011] 优选,所述的低共熔溶剂与缓冲液混合的体积比为1-40:100。

[0012] 优选,所述的催化转化反应条件为:30℃-60℃、pH 7.0-9.0,反应时间2-48h。

[0013] 优选,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的宿主菌株为大肠杆菌、酵母菌、谷氨酸棒状杆菌、芽孢杆菌或乳酸杆菌。

[0014] 优选,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的宿主菌株为大肠杆菌(E.coli)BL21(DE3)。

[0015] 优选,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株为经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA。

[0016] 优选,所述的表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株的加入量为10-200mg细胞湿重/mL反应体系,D-葡萄糖底物浓度为10-200g/L。

[0017] 本发明提供了一种以表达D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA的重组菌株大肠杆菌BL21/DPE-XYLA全细胞为催化剂催化D-葡萄糖制备D-阿洛酮糖的方法,并辅以含有氯化胆碱为组成之一的低共熔溶剂/磷酸缓冲液体系,用于提高D-阿洛酮糖得率。以甘油、尿素、乙二醇为第二组成部分形成的低共熔溶剂对全细胞的催化效率有显著提高,其中氯化胆碱/甘油、氯化胆碱/尿素、氯化胆碱/乙二醇分别在添加量为1%,5%,10%具有最佳促进效果,使得D-阿洛酮糖的得率分别提高40%、63.8%、66%。本发明提出的利用低共熔溶剂的方法对提高全细胞制备D-阿洛酮糖催化效率具有重要的应用价值。

附图说明

[0018] 图1是不同细胞催化D-葡萄糖制备D-阿洛酮糖的HPLC图谱,其中图A中的为含有DPE与XYLA基因编码序列的重组细胞,图B中的为不含有DPE与XYLA基因编码序列的大肠杆菌BL21细胞。

[0019] 图2不同低共熔溶剂及添加量对D-阿洛酮糖得率的影响;其中:D-Glucose:葡萄糖;D-fructose:果糖;D-psicose/allulose:阿洛酮糖;柱状图:糖得率;线点图:糖浓度;图A中的为氯化胆碱/甘油物质的量比为(2:1)的低共熔溶剂,图B中的为氯化胆碱/甘油物质的量比为(1:1)的低共熔溶剂,图C中的为氯化胆碱/尿素物质的量比为(2:1)的低共熔溶剂,图D中的为氯化胆碱/尿素物质的量比为(1:1)的低共熔溶剂,图E中的为氯化胆碱/乙二

醇物质的量比为(2:1)的低共熔溶剂,图F中的为氯化胆碱/乙二醇物质的量比为(1:1)的低共熔溶剂。

具体实施方式

[0020] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0021] 实验材料和试剂:

[0022] 1、菌株:本发明所应用的大肠杆菌重组菌株即大肠杆菌BL21/DPE-XYLA,含有D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE和木糖异构酶基因XYLA,由本申请人构建,该重组菌株及其中涉及的D-阿洛酮糖3-差向异构酶基因DPE、木糖异构酶基因XYLA的核苷酸序列已公开在申请号为:202010361005.2(申请公布号为:CN111455003A、申请公布日为:2020.07.28)、发明名称为:一种微藻制备D-阿洛酮糖的方法的专利申请中。

[0023] 2、D-阿洛酮糖标准品购自上海阿拉丁生化科技有限公司;EDTA钙二钠盐购自sigma公司;IPTG,硫酸卡那霉素、氯化胆碱、乙二醇、甘油、尿素、购自上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂均为化学纯或分析纯。

[0024] 3、溶液与培养基:

[0025] 大肠杆菌培养基LB(1%蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%NaCl,pH 7.0),121℃灭菌20min。

[0026] 硫酸卡那霉素:50mg/mL,0.22μm滤膜滤灭。

[0027] IPTG储液:1mol/L,0.22μm滤膜滤灭。

[0028] 实施例1

[0029] 1、全细胞菌株的诱导产酶

[0030] 将大肠杆菌BL21/DPE-XYLA转接至50mL含有卡那硫酸霉素的LB液体培养基,置于37℃180rpm摇床过夜培养,得到种子液。转接0.5%-2%新鲜种子液于1L新鲜的含有卡那硫酸霉素的LB液体培养基,置于37℃180rpm摇床培养2.5-3h,培养基OD₆₀₀达到0.6-0.8,加入终浓度为0.6-1μM的IPTG,培养基置于30℃180rpm摇床培养6-8h,诱导DPE与XYLA蛋白表达。得到的培养基通过冷冻离心(8000rpm,4℃,5min)收集菌体细胞,收集获得的细胞用ddH₂O水洗1-2次,离心去除ddH₂O,细胞用适量50mM pH7.0磷酸缓冲液重悬,使其浓度为50-400mg细胞湿重/mL缓冲液,保存于4℃备用。

[0031] 2、低共熔溶剂的制备

[0032] 氯化胆碱在50℃烘箱干燥至恒重,冷却至室温。按物质的量比分别称取氯化胆碱与相应氢键供体(甘油、尿素或乙二醇),混匀后,放入高温反应釜,升温至约80℃-90℃,低速搅拌混匀1-3h,直至形成均一透明的液体,冷却至室温后取出,密封保存备用。

[0033] 3、全细胞催化D-葡萄糖制备D-阿洛酮糖反应体系的验证

[0034] 配制反应体系:50g/L D-葡萄糖溶解于pH 7.0磷酸缓冲液中,添加Mg²⁺、Co²⁺浓度为5mM,加入经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA,细胞湿重浓度50mg/mL,于50℃反应24h后取反应液进行产物测定。以加入大肠杆菌BL21(不含有DPE与XYLA基因编码序列)的样品作为空白对照。

[0035] 产物测定方法:利用液相色谱进行产物测定,反应液经过高速离心(12000rpm,4℃,10min)去除蛋白以及不溶性杂质,取上清用0.22μm滤器过滤后,转移至液相色谱进样

瓶,进行产物检测。液相色谱仪为安捷伦Alliance2695,示差检测器2414,柱子选用Waters公司的Sugar-pakI钙基离子柱。流动相为50mM EDTA钙二钠盐,上样量10 μ L,柱温90 $^{\circ}$ C,流速为0.4mL/min。

[0036] 测定HPLC图谱结果如图1所示,由图可见,含有DPE与XYLA基因编码序列的大肠杆菌BL21全细胞具有催化D-葡萄糖制备D-阿洛酮糖的能力。

[0037] 4、不同氯化胆碱/甘油低共熔溶剂(ChCl/G)添加量对全细胞催化效率的影响

[0038] 配制反应体系:50g/L D-葡萄糖溶解于pH 7.0磷酸缓冲液中,添加Mg²⁺、Co²⁺终浓度为5mM,加入一定量ChCl/G(物质的量比为2:1或1:1),使其在反应体系中终浓度分别为0(即不添加),1%,5%,10%,20%,加入经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA,细胞湿重浓度50mg/mL,于50 $^{\circ}$ C反应24h后取反应液进行产物测定。以加入大肠杆菌BL21(不含有DPE与XYLA基因编码序列)、且不添加共熔溶剂的样品作为对照(CK)。

[0039] 结果如图2A、2B所示,由图可见,ChCl/G(1:2)与ChCl/G(1:1)的最佳添加比例均为1%,促使D-阿洛酮糖的得率分别提高至12.34%、11.13%,相较于0共熔溶剂添加量反应体系分别提高了40%、27%。

[0040] 5、不同氯化胆碱/尿素低共熔溶剂(ChCl/U)添加量对全细胞催化效率的影响

[0041] 配制反应体系:50g/L D-葡萄糖溶解于pH 7.0磷酸缓冲液中,添加Mg²⁺、Co²⁺终浓度为5mM,加入一定量ChCl/U(物质的量比为2:1或1:1),使其在反应体系中终浓度分别为0(即不添加),1%,5%,10%,20%,加入经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA,细胞湿重浓度50mg/mL,于50 $^{\circ}$ C反应24h后取反应液进行产物测定。以加入大肠杆菌BL21(不含有DPE与XYLA基因编码序列)、且不添加共熔溶剂的样品作为对照(CK)。

[0042] 结果如图2C、2D所示,由图可见,ChCl/U(1:2)与ChCl/U(1:1)的最佳添加比例均为5%,促使D-阿洛酮糖的得率分别提高至12.34%、12%,相较于0共熔溶剂添加量反应体系分别提高了63.8%、40%。

[0043] 6、不同氯化胆碱/乙二醇低共熔溶剂(ChCl/EG)添加量对全细胞催化效率的影响

[0044] 配制反应体系:50g/L D-葡萄糖溶解于pH 7.0磷酸缓冲液中,添加Mg²⁺、Co²⁺终浓度为5mM,加入一定量ChCl/EG(物质的量比为2:1或1:1),使其在反应体系中终浓度分别为0(即不添加),1%,5%,10%,20%,加入经过IPTG诱导的大肠杆菌BL21/DPE-XYLA,细胞湿重浓度50mg/mL,于50 $^{\circ}$ C反应24h后取反应液进行产物测定。以加入大肠杆菌BL21(不含有DPE与XYLA基因编码序列)、且不添加共熔溶剂的样品作为对照(CK)。

[0045] 结果如图2E、2F所示,由图可见,ChCl/EG(1:2)与ChCl/EG(1:1)的最佳添加比例均为10%,促使D-阿洛酮糖的得率均提高至13%,相较于0共熔溶剂添加量反应体系提高66%。

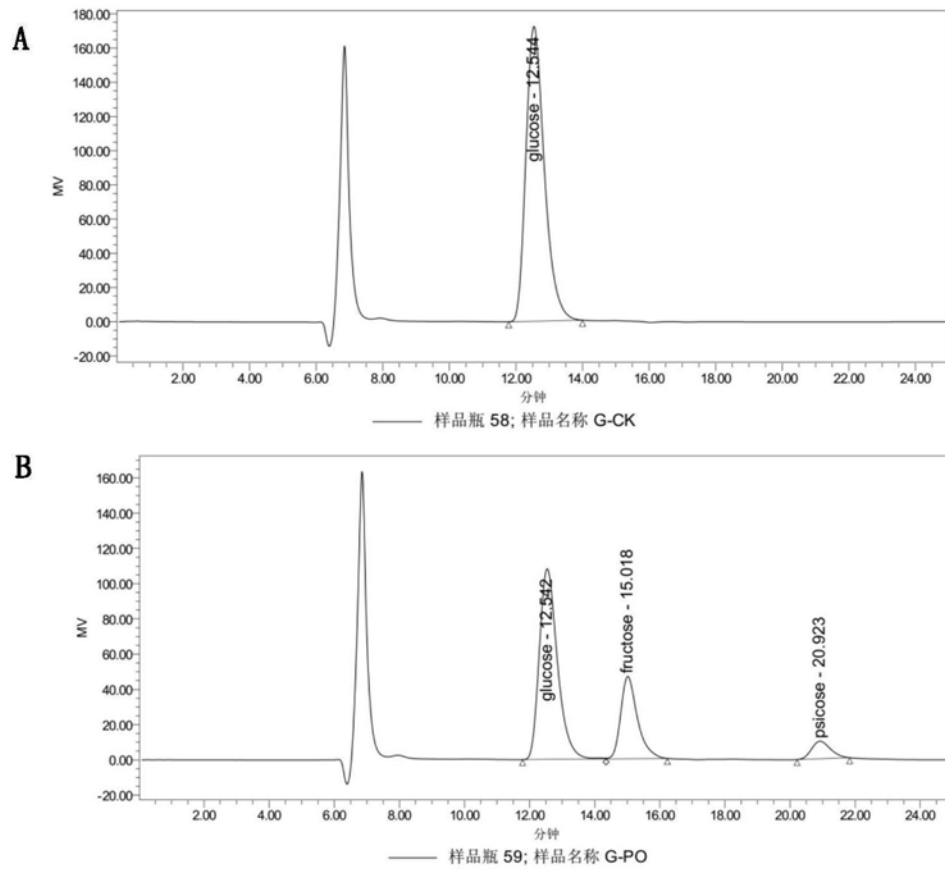
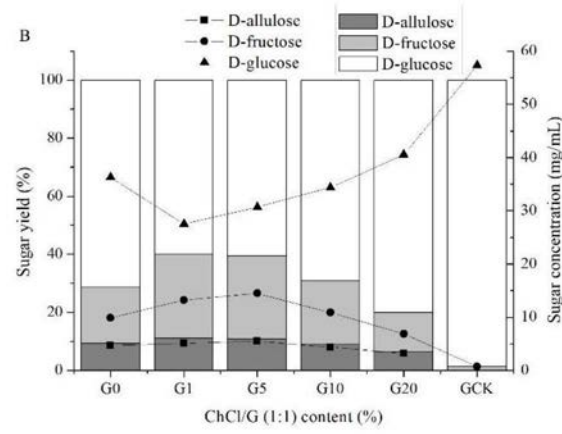
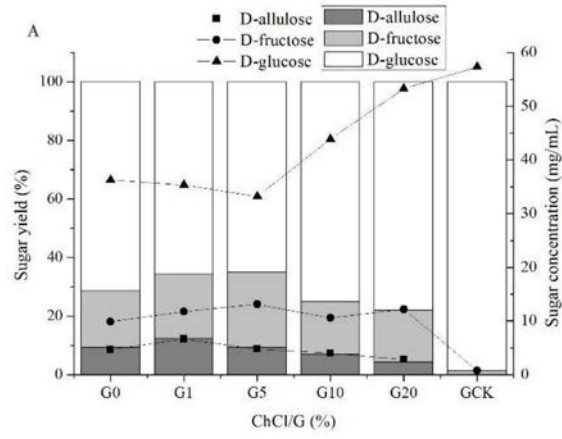


图1



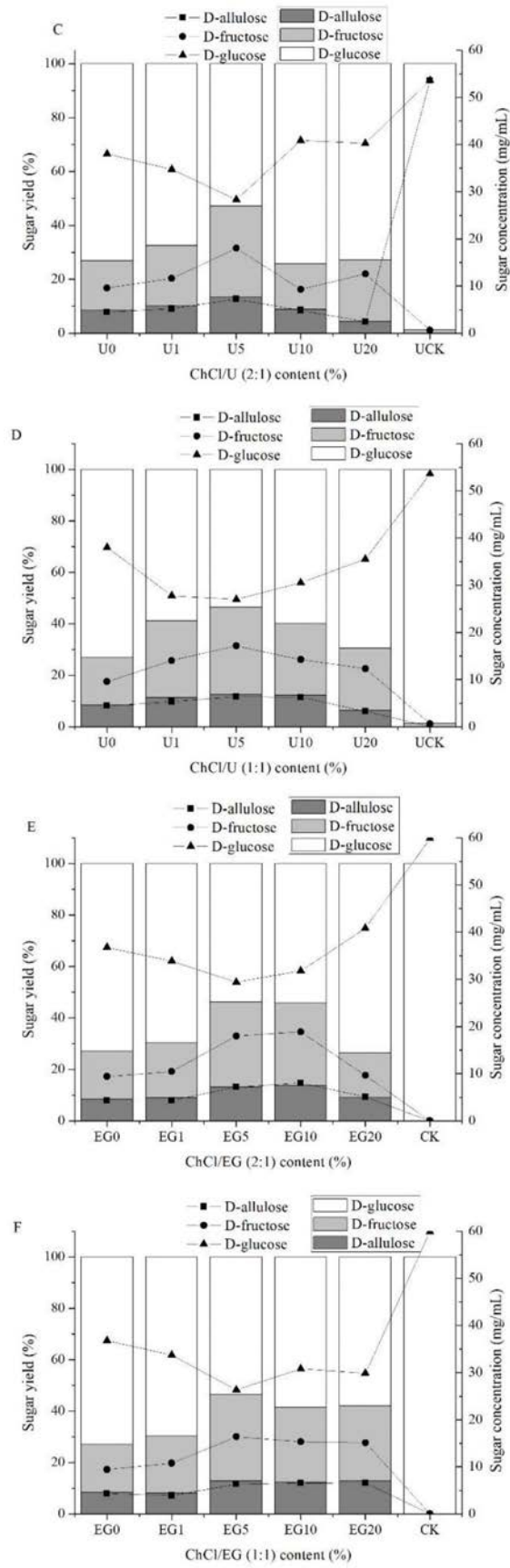


图2