

• 工业生物技术 •

# 多酶级联反应合成能够促进肠道益生菌生长的纤维寡糖

郑棚<sup>1,2</sup>, 王雷<sup>2,3</sup>, 胡美荣<sup>2</sup>, 魏华<sup>1\*</sup>, 陶勇<sup>2,3</sup>

1 南昌大学中德联合研究院, 江西 南昌 330047

2 中国科学院微生物研究所 中国科学院微生物生理与代谢工程重点实验室, 北京 100101

3 中国科学院大学, 北京 100049

郑棚, 王雷, 胡美荣, 魏华, 陶勇. 多酶级联反应合成能够促进肠道益生菌生长的纤维寡糖[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3406-3420.

ZHENG Peng, WANG Lei, HU Meirong, WEI Hua, TAO Yong. Synthesis of cello-oligosaccharides which promotes the growth of intestinal probiotics by multi-enzyme cascade reaction[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3406-3420.

**摘要:** 聚合度 2-6 的可溶性纤维寡糖是一种具有多种生物功能的低聚糖, 它能够促进双歧杆菌(*Bifidobacteria*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracei*)等肠道益生菌的增殖, 因此对人体肠道微生态具有调节作用。本研究通过在大肠杆菌中表达纤维寡糖磷酸化酶(cellobextrin phosphorylase, CDP), 构建 Cc 01 菌株, 并与之前构建的 COS 01 菌株联合使用, 建立了基于 COS 01、Cc 01 的三酶级联反应催化底物葡萄糖和蔗糖合成纤维寡糖反应体系。经过优化后, 最终可溶性纤维寡糖的产量达到 97 g/L, 纯度约为 97%, 其中含有纤维二糖(16.8 wt%)、纤维三糖(49.8 wt%)、纤维四糖(16.4 wt%)、纤维五糖(11.5 wt%)和纤维六糖(5.5 wt%)。在纤维寡糖对益生菌生长促进作用的测试中, 以菊粉、低聚木糖、低聚果糖为基准, 干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)以及嗜酸乳杆菌(WSH 006)利用纤维寡糖(聚合度 2-6)为碳源进行生长后, 益生菌的生物量( $OD_{600}$ )相比对照增加约 2 倍。该研究证明了三酶级联反应能够高效合成纤维寡糖, 并表明聚合度 2-6 的纤维寡糖是一类具有促进肠道微生物增殖的功能性碳水化合物。

**关键词:** 纤维寡糖; 全细胞催化; 磷酸化酶; 功能性碳水化合物; 肠道益生菌

资助项目: 国家重点研发计划(2017YFD0502102-3)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0502102-3).

\*Corresponding author. E-mail: weihua@ncu.edu.cn

Received: 2022-11-13; Accepted: 2023-02-02; Published online: 2023-02-10

# Synthesis of cello-oligosaccharides which promotes the growth of intestinal probiotics by multi-enzyme cascade reaction

ZHENG Peng<sup>1,2</sup>, WANG Lei<sup>2,3</sup>, HU Meirong<sup>2</sup>, WEI Hua<sup>1\*</sup>, TAO Yong<sup>2,3</sup>

1 Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, Jiangxi, China

2 CAS Key Laboratory of Microbial Physiological and Metabolic Engineering, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Soluble cello-oligosaccharide with 2–6 oligosaccharide units is a kind of oligosaccharide with various biological functions, which can promote the proliferation of intestinal probiotics such as *Bifidobacteria* and *Lactobacillus paracei*. Therefore, it has a regulatory effect on human intestinal microbiota. In this study, a Cc 01 strain was constructed by expressing cellodextrin phosphorylase (CDP) in *Escherichia coli*. By combining with a previously constructed COS 01 strain, a three-enzyme cascade reaction system based on strains COS 01 and Cc 01 was developed, which can convert glucose and sucrose into cello-oligosaccharide. After optimization, the final titer of soluble cello-oligosaccharides with 2–6 oligosaccharide units reached 97 g/L, with a purity of about 97%. It contained cellobiose (16.8 wt%), cellotriose (49.8 wt%), cellotetraose (16.4 wt%), cellopentaose (11.5 wt%) and cellohexose (5.5 wt%). When using inulin, xylo-oligosaccharide and fructooligosaccharide as the control substrate, the biomass ( $OD_{600}$ ) of *Lactobacillus casei* (WSH 004), *Lactobacillus paracei* (WSH 005) and *Lactobacillus acidophilus* (WSH 006) on cello-oligosaccharides was about 2 folds higher than that of the control. This study demonstrated the efficient synthesis of cello-oligosaccharides by a three-enzyme cascade reaction and demonstrated that the synthesized cello-oligosaccharides was capable of promoting intestinal microbial proliferation.

**Keywords:** cello-oligosaccharides; whole-cell catalysis; phosphorylase; functional carbohydrates; intestinal probiotics

纤维寡糖(cello-oligosaccharide)又称纤维低聚糖,通常是指由 2–10 个 D-葡萄糖单体通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而形成的线性寡糖<sup>[1]</sup>。分子式为  $(C_6H_{10}O_5)_n$  ( $n=2-10$ ), 当  $n=2$  时形成纤维二糖(cellobiose), 当  $n=3$  时形成纤维三糖(cellotriose), 当  $n=4$  时形成纤维四糖(cellotetraose), 当  $n=5$  时形成纤维五糖(cellopentaose)等以此类推, 但是

当寡糖的聚合度  $n>6$  时水溶性较低。目前, 纤维寡糖被发现是一种对人体肠道健康有益的新型益生元, 它经过益生菌发酵后会释放能量和短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SFCA), 主要包括醋酸、丙酸和丁酸, 它们能够降低肠道内 pH 值, 从而抑制致病菌的增殖, 维持机体肠道微生态的稳定, 改善胃肠功能<sup>[2-4]</sup>; 此外, 纤维寡糖还

具有促进机体对钙等矿物质的吸收,改善骨骼健康<sup>[5]</sup>;刺激机体免疫调节系统来应对炎症反应等益生元功能<sup>[6-7]</sup>。纤维寡糖还具有一定甜度,但是人体内不存在 $\beta$ -1,4糖苷键水解酶,因此人体不能对其消化吸收,使得纤维寡糖可作为甜味剂添加到食品中,满足糖尿病患者对甜食的需求<sup>[6,8]</sup>。除上述外,纤维寡糖还具有刚性结构并且稳定性好,可以广泛应用于保健品行业、制药工业和医药行业等领域<sup>[9-10]</sup>,具有良好的应用潜力和发展前景。

纤维素是地球上最丰富的自然资源,是多个葡萄糖单体通过 $\beta$ -1,4糖苷键连接而成,由于其内部稳定的分子结构,因此纤维素需要被水解成单糖或多糖,才能够转化为可持续的生物燃料和其他增值产品<sup>[11-12]</sup>。如果用传统方法对自然界的纤维素进行降解,就需要先用稀硫酸或稀碱液对其进行预处理,预处理时操作繁琐且步骤复杂,在预处理之后的纤维素酶解反应中,还要对酶解时间、反应温度、反应缓冲液pH等条件进行优化<sup>[13]</sup>,这是一种高成本、费时、复杂且环境不友好的处理方法。除此之外,参与降解纤维素的酶系中,除了内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶外,还包括 $\beta$ -葡萄糖苷酶,这会使得产生的纤维寡糖进一步水解成葡萄糖,从而降低纤维寡糖的转化率<sup>[14-15]</sup>。因此,为了达到工业化生产的要求,需要开发一种新型、绿色、高效、有前景的纤维寡糖生产技术。之前有研究表明自然界中一些降解纤维素的菌株<sup>[16-18]</sup>能够产生纤维二糖磷酸化酶(cellobiose phosphorylase, CBP)和纤维寡糖磷酸化酶(cellodextrin phosphorylase, CDP)<sup>[17,19]</sup>。这两种磷酸化酶均属于糖苷水解酶94家族(glycoside hydrolase family 94, GH94),能催化可逆的磷酸化反应,同时对 $\beta$ -1,4糖苷键具有高度的专一性<sup>[16,20]</sup>。而纤维寡糖生产中最重要

的糖基供体葡萄糖-1-磷酸(glucose-1-phosphate, G-1-P)可以由蔗糖磷酸化酶(sucrose phosphorylase, SP)催化蔗糖得到,之后CBP再催化G-1-P脱去磷酸基团与葡萄糖缩合,生成纤维二糖,而CDP能够在纤维二糖的基础上与G-1-P进一步聚合,生成聚合度 $\geq 3$ 的纤维寡糖(图1),如纤维三糖、纤维四糖、纤维五糖、纤维六糖等<sup>[21-22]</sup>。所以想要得到更多的纤维寡糖(聚合度3-6),CDP的表达和活性至关重要,陶勇等<sup>[23]</sup>认为单个细胞在特定生理条件下所表达的蛋白质总量是相对恒定的,并且在细胞内不同类型蛋白质之间的表达和活性具有一定比例。因此,本文设计了两种不同的策略催化蔗糖和葡萄糖合成纤维寡糖。在前期的研究中<sup>[24]</sup>,我们在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中共表达SP和CBP,构建了高产纤维二糖的菌株COS 01<sup>[24]</sup>。本文在此基础上,构建SP-CBP-CDP三酶串联的全细胞催化剂,以葡萄糖和蔗糖为底物高效合成纤维寡糖,同时优化了全细胞催化反应相关的条件(底物的浓度及比例、菌的用量及比例、缓冲液pH、反应温度)。同时,副产物果糖和残留的葡萄糖和蔗糖通过酵母发酵法去除以利于产物的纯化,最后获得了97 g/L可溶性的纤维寡糖,其纯度约为97%。评价纤维寡糖(聚合度2-6)对具有代表性的益生菌菌株的生长促进作用。参照常见的益生元(低聚果糖、低聚木糖、菊粉)以及和纤维二糖进行对比后,纤维寡糖(聚合度2-6)可以显著促进干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracei*)以及嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的生长,但是双歧杆菌属(*Bifidobacteria*)的菌株则在纤维寡糖(聚合度2-6)中生长情况较差,本研究表明了纤维寡糖(聚合度2-6)是一种新型的多功能碳水化合物。

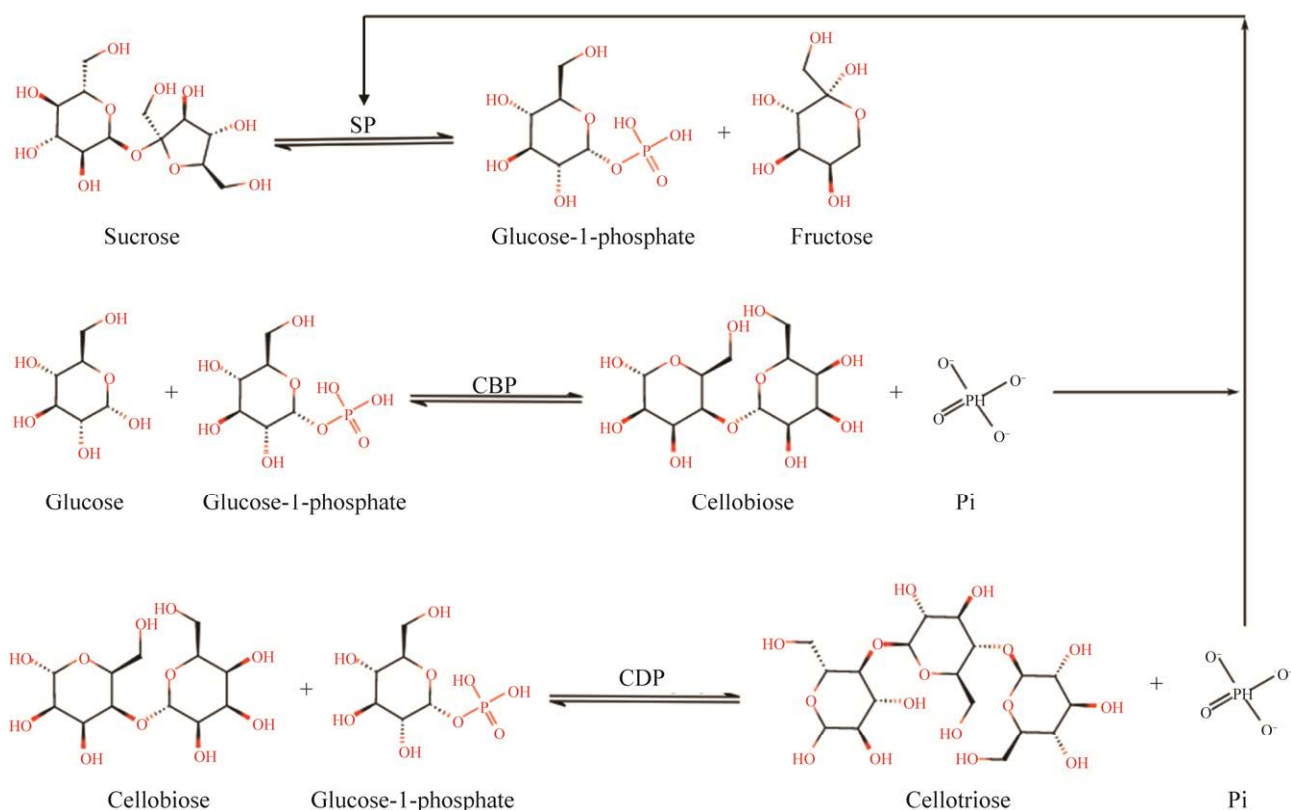


图 1 SP、CBP 和 CDP 三种磷酸化酶催化葡萄糖和蔗糖合成纤维寡糖

Figure 1 SP, CBP and CDP phosphorylases convert glucose and sucrose into cello-oligosaccharide.

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

克隆宿主大肠杆菌 *E. coli* Mach1-T1 Phage Resistant 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 表达宿主大肠杆菌 *E. coli* BW25113、酿酒酵母 Y 01、干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)、嗜酸乳杆菌(WSH 006)、长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*, BL 01)和表达载体 pYB1s (包含 pBAD 启动子和 *rrnB* 终止子)均由本实验室保存, 研究中用到的菌株及质粒见表 1。

### 1.2 试剂和仪器

质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 纯化试剂盒、Cycle-Pure (CP) 纯化试剂盒等购自

Omega 公司。限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶和 Gibson 试剂盒购自 Vazyme Biotech 公司。硫酸链霉素和蛋白分子量标准 Marker 购自诺唯赞(上海)股份有限公司, DNA 分子量标准 Marker 购自擎科生物有限公司, 引物合成与核酸序列测定均由擎科生物有限公司完成。葡萄糖、纤维二糖、果糖等标准品购自上海麦克林生化科技有限公司, 纤维三糖、纤维四糖、纤维五糖、纤维六糖等标准品购自 TaKaRa 公司。安捷伦高效液相色谱分析仪; 色谱柱 Aminex<sup>®</sup> HPX-42A (Bio-Rad 公司); 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司); SDS-PAGE 电泳仪 (Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机(Thermo 公司)。

### 1.3 培养基和培养条件

种子及发酵培养基: 16 g/L 胰蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物, 5 g/L 氯化钠。

表 1 本研究中所用到的质粒及菌株

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Source
Strains		
Trans T1	Wild type	This lab
BW25113	Wild type	This lab
BASP	BW25113 harboring pYB1s-BASP	This study
CGCBP	BW25113 harboring pYB1s-CGCBP	This study
COS 01	BW25113 harboring pYB1s-CGCBP-BASP	This study
COS 02	BW 25113 harboring pYB1s-BASP-CGCBP	This study
Cc 01	BW25113 harboring pYB1s-CcCDP	This study
RT 01	BW25113 harboring pYB1s-RTCDP	This study
Ta 01	BW25113 harboring pYB1s-TaCDP	This study
Plasmids		
pYB1s	Expression vector	This lab
pYB1s-BASP	Containing SP gene from <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	This study
pYB1s-CGCBP	Containing CBP gene from <i>Cellvibrio gilvus</i>	This study
pYB1s-CGCBP-BASP	Containing CBP gene from <i>C. gilvus</i> , and SP gene from <i>B. adolescentis</i>	This study
pYB1s-BASP-CGCBP	Containing SP gene from <i>B. adolescentis</i> , and CBP gene from <i>C. gilvus</i>	This study
pYB1s-CcCDP	Containing CDP gene from <i>Clostridium cellulosi</i>	This study
pYB1s-RTCDP	Containing CDP gene from <i>Ruminiclostridium thermocellum</i> YM4	This study
pYB1s-TaCDP	Containing CDP gene from <i>Thermosiphon africanus</i> TCF52B	This study

种子液培养：保藏的甘油菌以 1% 比例接种于 5 mL 种子培养基中(链霉素浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 8 h。

MRS 培养基：10 g/L 蛋白胨，20 g/L 葡萄糖，5 g/L 乙酸钠，5 g/L 牛肉粉，4 g/L 酵母粉，2 g/L 磷酸氢二钾，2 g/L 柠檬酸三铵，0.2 g/L 硫酸镁，0.05 g/L 硫酸锰，1 mL 吐温 80。

摇瓶发酵培养：将种子液按 1% 比例接种到 100 mL 发酵培养基中(链霉素浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 3 h，当  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 左右时，加入 2 g/L 阿拉伯糖，25  $^{\circ}\text{C}$  诱导 12 h。诱导结束后，菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 10 min，倒掉上清液后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

#### 1.4 重组质粒的构建

根据蔗糖磷酸化酶基因序列 BASP<sup>[25]</sup> (GenBank 登录号：AF543301.1) 设计引物 SP-F 和 SP-R，上游引物 SP-F 的 5' 端加入 *Xho* I 酶切

位点，下游引物 SP-R 的 5' 端加入 *EcoR* I 酶切位点。根据纤维二糖磷酸化酶基因序列 CGCBP<sup>[24]</sup> (GenBank 登录号：BAA28631.1) 设计引物 CB-F 和 CB-R，上游引物 CB-F 的 5' 端加入 *Xho* I 酶切位点，下游引物 CB-R 的 5' 端加入 *EcoR* I 酶切位点。再设计纤维二糖磷酸化酶和蔗糖磷酸化酶的串联引物 BC1 和 BC2，引物 BC1 包含 BASP 上游 20 bp 同源序列，引物 BC2 包含 CGCBP 下游 20 bp 同源序列。

根据纤维寡糖磷酸化酶基因序列 TaCDP<sup>[26]</sup> (GenBank 登录号：CP001185.1)，CcCdP<sup>[22]</sup> (GenBank 登录号：CDZ24361.1)，RTCDP (GenBank 登录号：BAB71818) 设计引物 Ta-F 和 Ta-R、Cc-F 和 Cc-R、RT-F 和 RT-R，上游引物的 5' 端加入 *Xho* I 酶切位点，下游引物的 5' 端加入 *EcoR* I 酶切位点(引物见表 2)，引物均交由擎科生物科技有限公司合成。

表 2 本研究中所用的引物

Table 2 Primers used in this study

Name	Primer sequence (5'→3')	Restriction site
SP-F	GCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <u>CTCGAGA</u> ATTCGCGATCACGCACGCG	<i>Xho</i> I
SP-R	CAGCTGCAGACCGAGCTCACCGA <u>AATTCA</u> ATTTCCGTCAGGCGACGA	<i>EcoR</i> I
CB-F	GCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <u>CTCGAG</u> CGCTATGGTCACTTCGACGA	<i>Xho</i> I
CB-R	CAGCTGCAGACCGAGCTCACCGA <u>AATTCA</u> ACGACGGTTTCAGCGATG	<i>EcoR</i> I
BC1	CGCTGAAACCGTCGTTGAAGGAGATATACCATGAAAAACAAGGTGCAGC	
BC2	GCTGCACCTTGTTCATGGTATATCTCCTTCAACGACGGTTTCAGCG	
Ta-F	GCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <u>CTCGAG</u> TTGAAAAAATTTGACTTTGT	<i>Xho</i> I
Ta-R	CAGCTGCAGACCGAGCTCACCGA <u>AATTCA</u> AATAACATATAACTTCGTC	<i>EcoR</i> I
Cc-F	GCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <u>CTCGAG</u> ATGATAACAAAAGTAACTCC	<i>Xho</i> I
Cc-R	CAGCTGCAGACCGAGCTCACCGA <u>AATTCT</u> TACCGCCGGTTTCTTTCA	<i>EcoR</i> I
RT-F	GCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <u>CTCGAG</u> ATGATTACTAAAGTAAACAGC	<i>Xho</i> I
RT-R	AGCTGCAGACCGAGCTCACCGA <u>AATTCT</u> TATTTAACTTAAGAGTCA	<i>EcoR</i> I

Restriction sites are underlined.

分别以青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、纤维弧菌 (*Cellvibrio*)、非洲嗜热管菌 (*Thermosiphon africanus* TCF52B)、纤维素梭状芽胞杆菌 (*Clostridium cellulosi*)、嗜热瘤胃杆菌 (*Ruminiclostridium thermocellum* YM4) 的全基因组序列为模板, 进行 PCR 扩增得到基因片段 BASP、CGCBP、TaCDP、CcCDP、RTCDP。载体质粒 pYB1s 用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切得到载体片段, 上述得到的片段均采用切胶回收的方式进行回收纯化。将获得的基因片段与载体片段采用 Gibson assembly 试剂盒进行连接, 得到重组质粒 pYB1s-BASP、pYB1s-CGCBP、pYB1s-CGCBP-BASP、pYB1s-CcCDP、pYB1s-TaCDP 和 pYB1s-RTCDP, 将构建的重组质粒分别转入大肠杆菌 *E. coli* Trans-T1 感受态细胞中, 在含链霉素 (链霉素浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性的平板上挑取阳性单克隆进行测序鉴定, 测序成功后获得重组质粒。

### 1.5 纤维寡糖的生物合成及纯化

将得到的重组质粒 pYB1s-CGCBP-BASP、pYB1s-CcCDP、pYB1s-TaCDP 和 pYB1s-RTCDP 分别转入表达宿主大肠杆菌 *E. coli* BW25113

中, 构建全细胞生物催化剂, 分别命名为 COS 01、RT 01、Ta 01、Cc 01。为了对比 3 种 CDP 酶的活性, 设计 3 种方案来进行测试。

方案 1 (COS 01+Cc 01): 取诱导结束的重组菌 COS 01=10  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), Cc 01=5  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), 离心去除上清液后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

方案 2 (COS 01+Ta 01): 取诱导结束的重组菌 COS 01=10  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), Ta 01=5  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), 离心去除上清液后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

方案 3 (COS 01+RT 01): 取诱导结束的重组菌 COS 01=10  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), RT 01=5  $OD/\text{mL}$  ( $OD_{600}$ ), 离心去除上清液后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。

全细胞催化反应条件的优化: 两种底物 (葡萄糖:蔗糖) 比例 0.4:1、0.6:1、0.8:1、1:1, 磷酸盐缓冲液的 pH 为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0, 反应温度为  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 反应中全细胞催化剂 COS 01 的生物量 ( $OD_{600}$ ) 10  $OD/\text{mL}$ , Cc 01 的生物量 ( $OD_{600}$ ) 设置为 3、4、5、6、7、8  $OD/\text{mL}$ , 优化实验反应时间均为 12 h。

在反应过程中, 除了目的产物纤维寡糖外, 还会存在副产物果糖, 以及残留的葡萄糖和蔗糖保留在反应体系中, 这些副产物果糖和残留底物

(葡萄糖和蔗糖)可通过酵母发酵法进行去除,以纯化纤维寡糖。将酿酒酵母 Y 01 在无抗性的 YPD 固体培养基上进行划线,30 °C 条件下倒置培养 24 h。之后挑取单克隆转接到无抗性 5 mL 液体 YPD 培养基中,30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h。再以 1% 接种量转接到含 50 mL YPD 的 250 mL 挡板摇瓶中,30 °C、220 r/min 振荡培养 24 h,24 h 后 6 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。将上清液在 90 °C 热水浴中处理 5 min,6 000 r/min 离心 10 min 去除杂蛋白,得到初步纯化的纤维寡糖混合溶液。将寡糖混合液稀释一倍后加入到酿酒酵母 Y 01 中进行脱糖,反应 24 h 后 5 000 r/min 离心 10 min,获得寡糖溶液,之后取样分析,对纤维寡糖和副产物葡萄糖、果糖等进行测定。

再进行脱色处理,将寡糖溶液加热至 70 °C,加入活性炭粉末(4 g/L),加热搅拌处理 45 min,脱色结束后利用真空泵进行抽滤(2-3 次)去除活性炭粉末,得到的寡糖溶液将倒入预冷的丙酮(体积比 1:9)搅拌,4 °C 孵育过夜,5 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀物。然后进行冷冻干燥获得纤维寡糖(聚合度 2-6)产品。

### 1.6 纤维寡糖的检测

使用安捷伦高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)对全细胞催化反应产物纤维寡糖、底物葡萄糖和副产物果糖的浓度进行测定。全细胞催化反应液离心后取上清,用去离子水稀释 50 倍,再过 0.22 μm 的滤膜后制得样品,上样量 10 μL。色谱柱为 Aminex® HPX-42A, (300 mm×7.8 mm), 色谱条件如下:流动相为去离子水(煮沸 10 min, 抽滤过膜, 超声排气 30 min); 柱温 80 °C; 流速为 0.5 mL/min; 检测时间 25 min; 通过示差折光检测器(refractive index detector, RID)进行检测,采用外标法绘制标准曲线对催化反应体系中的底物

和产物进行定量分析。每种标品的标准曲线回归方程如下:

$$\text{葡萄糖: } y=112\ 174x-2\ 632.6, R^2=0.998\ 4;$$

$$\text{果糖: } y=520\ 024x-2\ 597.7, R^2=0.999\ 9;$$

$$\text{蔗糖: } y=158\ 697x+2\ 179.8, R^2=0.999\ 4;$$

$$\text{纤维二糖: } y=196\ 890x-2\ 327.9, R^2=0.999\ 6;$$

$$\text{纤维三糖: } y=59\ 206x+764.4, R^2=0.999\ 5;$$

$$\text{纤维四糖: } y=167\ 452x-1\ 232.4, R^2=0.999\ 8;$$

$$\text{纤维五糖: } y=129\ 073x-5\ 611.8, R^2=0.994\ 5;$$

$$\text{纤维六糖: } y=137\ 947x-5\ 290, R^2=0.995\ 6。$$

### 1.7 纤维寡糖促进益生菌生长的性能评价

将-80 °C 保藏的长双歧杆菌(BL 01)、干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)、嗜酸乳杆菌(WSH 006)在固体 MRS 平板上进行活化,在 37 °C 厌氧培养 24-48 h。之后,在每个 MRS 板中挑取 1 个单克隆,转移到 MRS 液体培养基中,37 °C 厌氧培养 24 h。在无菌 96 孔板中加入 25 μL 菌液(初始菌液 4  $OD_{600}$ /mL), 135 μL MRS 培养基和 40 μL 葡萄糖/寡糖(50 mg/mL)溶液混合,使葡萄糖(阳性对照)、纤维二糖和低聚糖(纤维寡糖、低聚木糖、低聚果糖和菊粉)在培养基中的最终浓度为 10 mg/mL,在液体上方加入无菌的矿物油进行液封,将 96 孔板放置在 37 °C 培养箱中,根据菌种的生长周期,在 24-48 h 内定期取出测量菌体的吸光度( $OD_{600}$ ),所有的测定实验均进行 3 次平行操作。

## 2 结果与分析

### 2.1 磷酸化酶的异源表达

SP 催化蔗糖和无机磷生成 G-1-P 和果糖, CBP 催化 G-1-P 与葡萄糖缩合生成纤维二糖和无机磷, CDP 以纤维寡糖作为糖基受体,将 G-1-P 上的葡萄糖转移至受体上产生更高聚合度的纤维寡糖并释放出无机磷。含有蔗糖磷酸化酶和纤维二糖磷酸化酶的大肠杆菌菌株 BASP、

CGCBP 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图谱如图 2A 所示, BASP、CGCBP 蛋白分子量分别为 60.4、85.4 kDa。含纤维寡糖磷酸化酶的大肠杆菌菌株 CcCDP、RTCDP、TaCDP 的 SDS-PAGE 蛋白电泳图谱如图 2B 所示, CcCDP、RTCDP、TaCDP 蛋白分子量分别为 112.1、108.4、98.5 kDa (均带有 His-Tag)。

## 2.2 三种不同全细胞催化体系的比较

在之前的研究<sup>[24]</sup>中, 比较了 COS 01 中 BASP 和 CGCBP 两个基因在载体上的顺序对纤维二糖产量的影响, 通过观察两种全细胞催化剂的蛋白表达情况可以看出全细胞催化剂 COS 01 中两种磷酸化酶的可溶性表达比 COS 02 较好, 从获得纤维二糖的产量也可以得知, 含有质粒 pYB1s-CGCBP-BASP 的工程菌 COS 01 比含有质粒 pYB1s-BASP-CGCBP 的工程菌 COS 02 产生了更多的纤维二糖, 因此选择 COS 01 作为本

研究中的全细胞催化剂。但是 COS 02 中纤维二糖的产量较低可能是蛋白质在翻译过程中错误折叠形成没有活性的包涵体, 导致了酶活力的降低, 这也表明在载体上 2 个甚至多个基因的位置不同会影响酶的活性。因此, 当多个酶在同一质粒上同时表达时, 应考虑基因的顺序。

全细胞催化剂 COS 01 (BW 25113/pYB1s-CGCBP-BASP) SDS-PAGE 分析(图 3A), 根据蛋白电泳图可以看出 CGCBP 和 BASP 的可溶性表达较好。在经过全细胞催化反应后, 方案 1 (COS 01+Cc 01)相比方案 2 (COS 01+Ta 01)和方案 3 (COS 01+RT 01)更具备高产纤维寡糖的能力(图 3B), 虽然在图 2B 中 3 种纤维寡糖磷酸化酶中 RTCDP 的可溶性表达比 TaCDP 和 CcCDP 更好, 但是在反应中明显 CcCDP 生产纤维寡糖(聚合度 3-6) 的能力最强, 在图 3B 中可以看出 COS 01+Cc 01 在 0.5 mol/L 蔗糖和葡萄糖为底物的

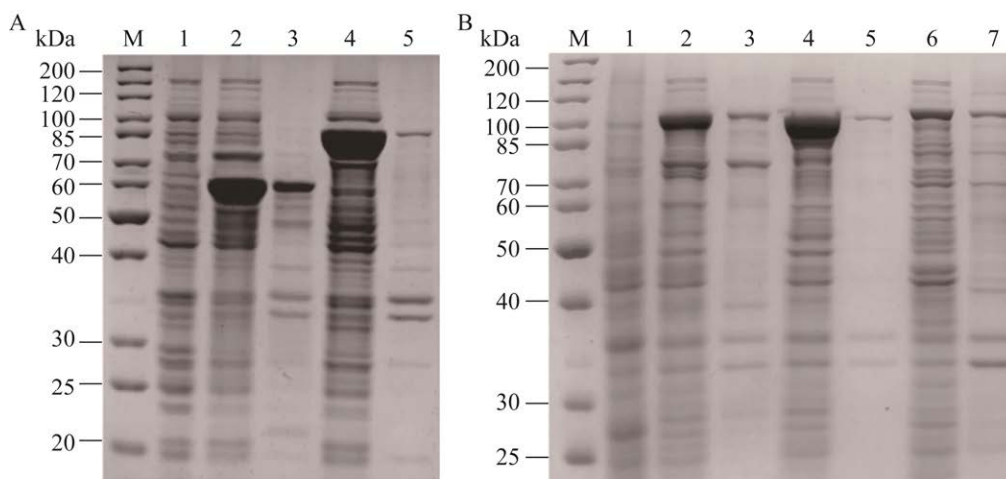


图 2 三种磷酸化酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of three phosphorylases. A: SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. Lane M: Protein marker; Lane 1: Control *E. coli* BW 25113; Lane 2: Soluble extract of *E. coli* expressing BASP; Lane 3: Insoluble extract of *E. coli* expressing BASP; Lane 4: Soluble extract of *E. coli* expressing CGCBP; Lane 5: Insoluble extract of *E. coli* expressing CGCBP. B: SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. Lane M: Protein marker; Lane 1: Control *E. coli* BW 25113; Lane 2: Soluble extract of *E. coli* expressing CcCDP; Lane 3: Insoluble extract of *E. coli* expressing CcCDP; Lane 4: Soluble extract of *E. coli* expressing RTCDP; Lane 5: Insoluble extract of *E. coli* expressing RTCDP; Lane 6: Soluble extract of *E. coli* expressing TaCDP; Lane 7: Insoluble extract of *E. coli* expressing TaCDP.



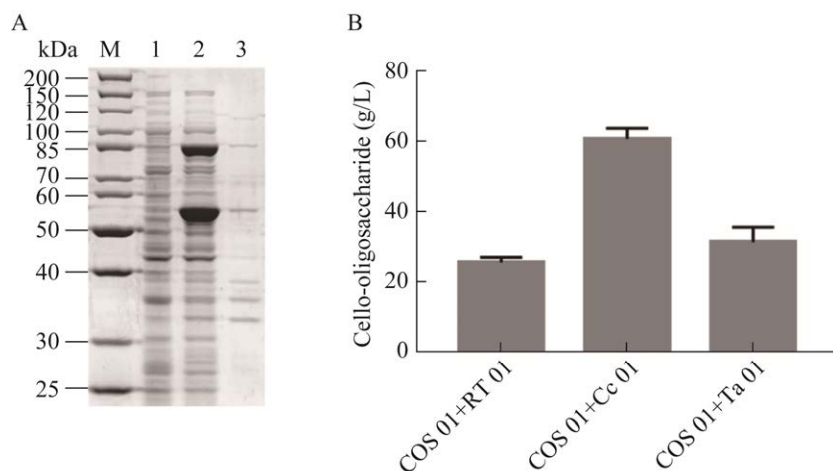


图3 三种不同全细胞催化体系的选择

Figure 3 Selection of three different whole cell catalytic systems. A: SDS-PAGE analysis of COS 01. Lane M: Protein marker; Lane 1: Control *E. coli* BW 25113; Lane 2: Soluble extract of CGBA; Lane 3: Insoluble extract of CGBA. B: Cello-oligosaccharide production from sucrose and glucose by using strategy 1, 2, and 3.

全细胞催化反应中总共获得了 61 g/L 的纤维寡糖(聚合度 3–6), COS 01+Ta 01 在 0.5 mol/L 蔗糖和葡萄糖为底物的全细胞催化反应中总共得到 32 g/L 的纤维寡糖(聚合度 3–6), COS 01+RT 01 在 0.5 mol/L 蔗糖和葡萄糖为底物的全细胞催化反应中总共得到了 26 g/L 的纤维寡糖(聚合度 3–6), 因此后续实验选择方案 1 (COS 01+Cc 01) 进行纤维寡糖的合成。

### 2.3 全细胞催化反应条件的优化

本研究中, 纤维寡糖的合成需要 3 步反应: 第 1 步蔗糖在 SP 催化作用下磷酸化为 G-1-P 和果糖; 第 2 步在 CBP 作用下 G-1-P 脱掉磷酸基团与葡萄糖缩合形成纤维二糖; 第 3 步纤维二糖在 CDP 作用下与糖基供体 G-1-P 缩合形成纤维三糖, 以此类推, 直至合成纤维三糖、纤维四糖等(图 1)。在整个的全细胞催化反应过程中释放的磷酸对寡糖合成具有重要影响, Wang 等<sup>[24]</sup>发现高浓度的磷酸盐促进 SP 生成 G-1-P, 但磷酸盐也会因为产物抑制而降低生成纤维二糖的反应速率。Zhong 等<sup>[27]</sup>发现反应中磷酸盐的去除能有效克服酶催化的热力学限制, 还可以有效的消

除 G-1-P 产生的动力学限制, 因此将 G-1-P 释放的磷酸盐用镁离子沉淀对推动反应合成纤维寡糖有着重要作用。由于反应中磷酸盐的含量几乎保持在一个稳定水平, 因此反应中加入相同浓度的镁离子来沉淀磷酸盐, 解除反应动力学对长链寡糖合成的影响。合适的催化反应条件才能提高生物催化剂的反应效率, Xu 等<sup>[28]</sup>研究发现缓冲液 pH 和反应温度是影响此类生物转化的重要影响因素。在之前的研究<sup>[27]</sup>中发现当葡萄糖/G-1-P 的比例 $\geq 0.25$  时, 不会得到不溶性的纤维寡糖(聚合度 $>6$ )。除此之外, 在产物中寡糖聚合度的丰富度也是衡量反应效率的重要标准, 还应该避免不溶性寡糖(聚合度 $>6$ )的生成, 因此这就需要控制反应进程中 CDP 的用量, 降低寡糖链的延伸效率和延伸长度, 防止不溶性寡糖的形成。

因此, 本研究对底物(葡萄糖和蔗糖)摩尔比、缓冲液 pH、反应温度、全细胞催化剂(COS 01+Cc 01)的比例对生成纤维寡糖产量的影响, 优化实验体系均为 1 mL, 反应时间均为 12 h。根据图 4A 所示, 当 2 种底物比例为 0.5:0.2 (蔗

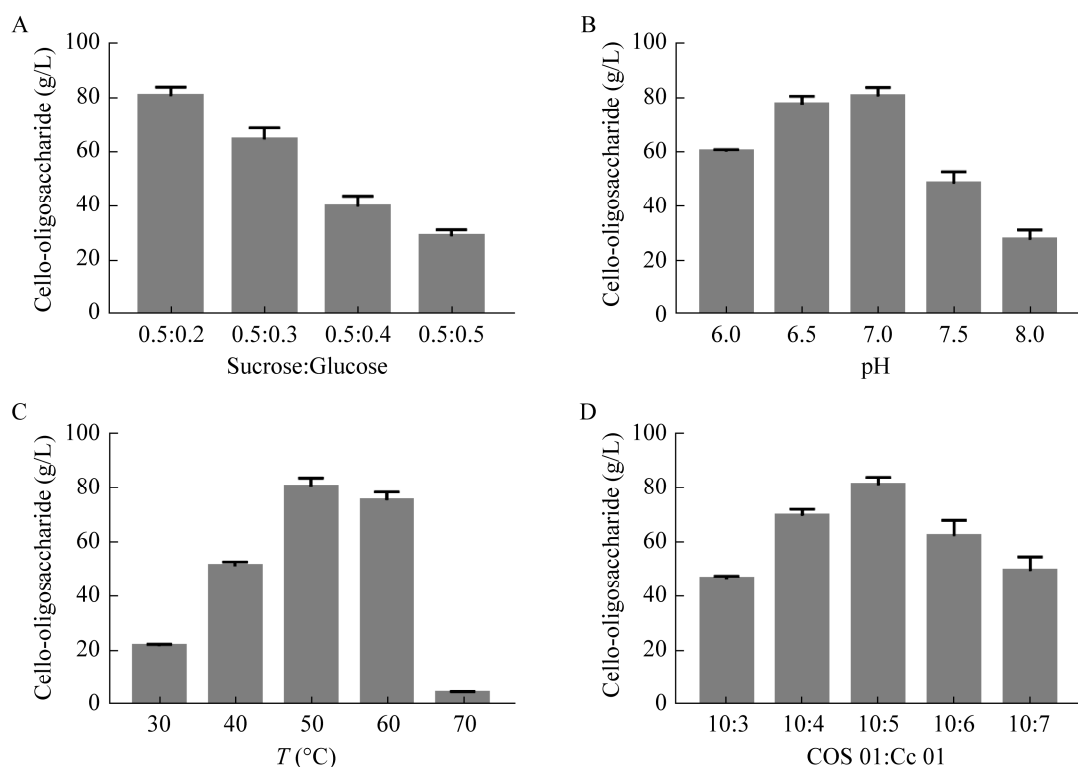


图 4 全细胞催化反应条件优化

Figure 4 Optimization of whole cell catalytic reaction conditions. Effect of concentration ratio of sucrose and glucose. A: Reaction pH. B: Reaction temperature. C: The ratio of two phosphorylases. D: On cello-oligosaccharide production.

糖 0.5 mol/L 和葡萄糖 0.2 mol/L)时,得到的纤维寡糖总量最高,之后在此条件下优化反应中磷酸盐缓冲液 pH 和反应温度以及全细胞催化剂 (COS 01+Cc 01)的比例。用磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)来评估 pH 对反应的影响,如图 4B 所示,生产纤维寡糖(聚合度 3–6)的最佳 pH 7.0。在该条件下筛选温度对纤维寡糖(聚合度 3–6)合成反应的影响,反应在 30–70 °C 条件下进行。当反应温度在 50 °C 时,获得纤维寡糖(聚合度 3–6)的含量达到 81 g/L (图 4C)。之后对反应中 COS 01 和 Cc 01 的生物量比例进行优化。由于在链延伸的过程中由于 CDP 酶活性较高而产生不溶性寡糖(聚合度>6),因此反应中 CDP 的生物量应该减少以降低寡糖链聚合效率,同时还应控制反应时间,防止不溶性产物的形成,促进可溶性产物的

形成。在蔗糖和葡萄糖浓度分别为 0.5 mol/L 和 0.2 mol/L 的条件下, COS 01 的生物量设置为  $OD_{600}=10$ , Cc 01 的生物量设置为  $OD_{600}=3、4、5、6、7$ , 最终, COS 01  $OD_{600}=10$ , Cc 01  $OD_{600}=5$  时, 纤维寡糖(聚合度 3–6)的产量达到 81 g/L (图 4D)。

## 2.4 纤维寡糖的合成及纯化

根据前面优化的条件,我们将反应体系扩大到 20 mL (50 mL 离心管)进行测试, 171.15 g/L (0.5 mol/L)蔗糖, 39.64 g/L (0.2 mol/L)葡萄糖, 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 50 mmol/L  $Mg^{2+}$ , COS 01  $OD_{600}=10$ , Cc 01  $OD_{600}=5$ , 50 °C 条件下反应 8 h。在 20 mL 的反应体系中(图 5A), 反应后获得约 97 g/L 的纤维寡糖(聚合度 2–6), 除此之外还含有剩余的果糖(72 g/L)、葡萄糖

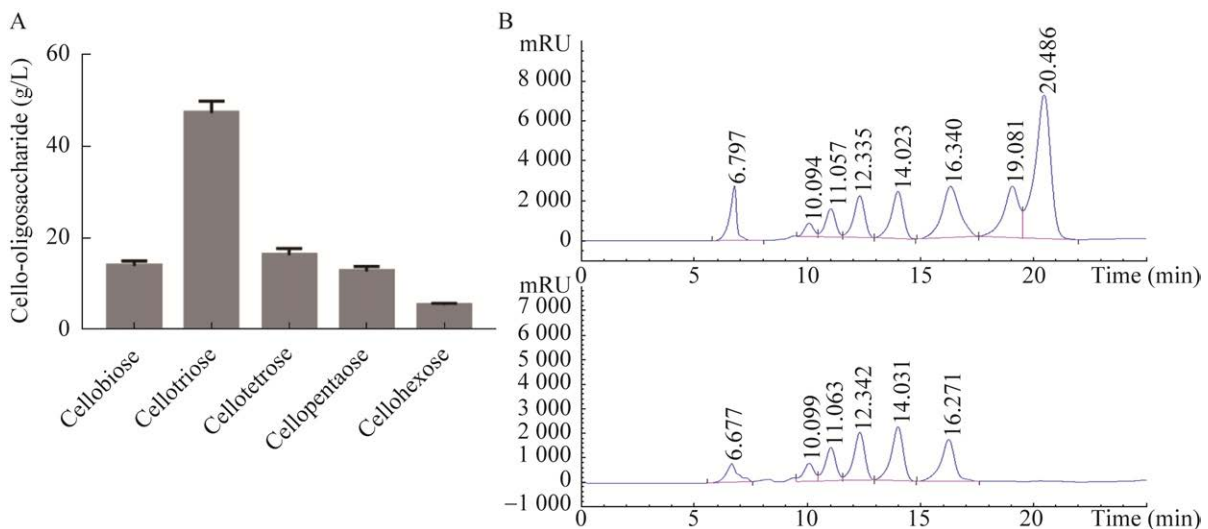


图5 纤维寡糖的合成及纯化

Figure 5 Efficient synthesis and purification of cello-oligosaccharides. A: Production of each oligosaccharide in a large volume reaction. B: Comparison of the cello-oligosaccharide before and after purification by HPLC.

(22 g/L)和蔗糖(17 g/L),因此需要选择合适的酿酒酵母进行脱糖纯化。我们在前期的实验<sup>[24]</sup>中选取了5株不同的酿酒酵母菌株(Y 01、Y 02、Y 03、Y 04、Y 05)进行实验,测试消耗葡萄糖和果糖的能力,发现菌株Y 01在反应12 h后可以消耗100 g/L果糖并且不会降解纤维二糖,100 g/L蔗糖、100 g/L葡萄糖在24 h后被完全消耗。因此,本次全细胞催化生产纤维寡糖的反应溶液选择Y 01处理果糖、葡萄糖等副产物,以利于纤维寡糖的纯化。在经过Y 01处理后,纤维寡糖溶液中的副产物果糖和残留底物葡萄糖被降解(图5B),由于纤维二糖和蔗糖均为双糖,因此在HPLC检测时2种糖的峰会重叠,而脱糖后峰面积的下降表明混合物中剩余的蔗糖被消耗,在脱糖前后的色谱图(图5B)对比中可以得知纤维寡糖基本不受影响。因此酿酒酵母Y 01在经过24 h脱糖后,溶液中的副产物果糖和残留底物葡萄糖、蔗糖被完全消耗。根据之前的研究<sup>[29]</sup>,本次实验利用丙酮(样品体积的9倍)从酵母脱糖后的混合液中沉淀纤维寡糖,经过风干、冷冻干燥后获得固体粉末,再用与之前相同体积的水再

次溶解,通过高效液相色谱分析发现,纤维寡糖浓度为97 g/L,分离出的纤维寡糖纯度约为97%,并且纯化后样品的成分和含量与之前几乎相同。因此,以上结果证明了多酶体系合成高纯度纤维寡糖的可能性。

## 2.5 纤维寡糖作为益生元促进肠道益生菌生长的性能评价

本研究将纤维寡糖(聚合度2-6)与纤维二糖对益生菌生长情况进行对比,进而突显以纤维三糖到纤维六糖为主的纤维寡糖混合物的潜在促进作用。我们采用前期反应得到的纤维寡糖来进行促进肠道益生菌生长性能的评价,使用的纤维寡糖组成如下:纤维二糖(16.8 wt%)、纤维三糖(49.8 wt%)、纤维四糖(16.4 wt%)、纤维五糖(11.5 wt%)和纤维六糖(5.5 wt%),同时以常见的益生元:低聚果糖(fructooligosaccharides, FOS)、低聚木糖(xylo-oligosaccharides, TOS)和菊粉为基准,葡萄糖作为阳性对照,选择干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)、嗜酸乳杆菌(WSH 006)以及长双歧杆菌(BL 01)来进行测试。

根据菌体生长曲线(图 6)可以看出,干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)以及嗜酸乳杆菌(WSH 006)在纤维寡糖(聚合度 2-6)上生长更好,在经过 54 h 生长后  $OD_{600}$  相比其他 5 种益生元更高,而长双歧杆菌在以葡萄糖为唯一碳源时  $OD_{600}$  最高。此外在以纤维寡糖作为唯一碳源培养基中(图 6A-6C)干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)和嗜酸乳杆菌(WSH 006)的生长速度相较其他几种益生元来说更快。我们还发现,除了长双歧杆菌(BL 01)外,其他 3 株益生菌在纤维寡糖(聚合度 2-6)为唯一碳源的培养基中无论是最终细胞密度还是生长速度均比纤维二糖为唯一碳源的培养基要

好,因此这也表明纤维寡糖中聚合度在 3-6 的寡糖混合为主要成分时,能更好地促进肠道益生菌的增殖。与此同时,如图 6A-6C 所示,与 TOS、FOS 和菊粉相比,干酪乳杆菌(WSH 004)、副干酪乳杆菌(WSH 005)以及嗜酸乳杆菌(WSH 006)利用纤维寡糖(聚合度 2-6)进行生长时最终  $OD_{600}$  增加了约 2.0 倍。如图 6D 所示,与前面 3 株益生菌相比,长双歧杆菌(BL 01)在葡萄糖上生长最好, FOS、TOS 和菊粉上生长适中,在纤维寡糖(聚合度 2-6)及纤维二糖生长较差,并且  $OD_{600}$  最大值高于纤维寡糖(聚合度 2-6)及纤维二糖。因此我们可以认为纤维寡糖(聚合度 2-6)具备成为益生菌新型益生元的潜力。

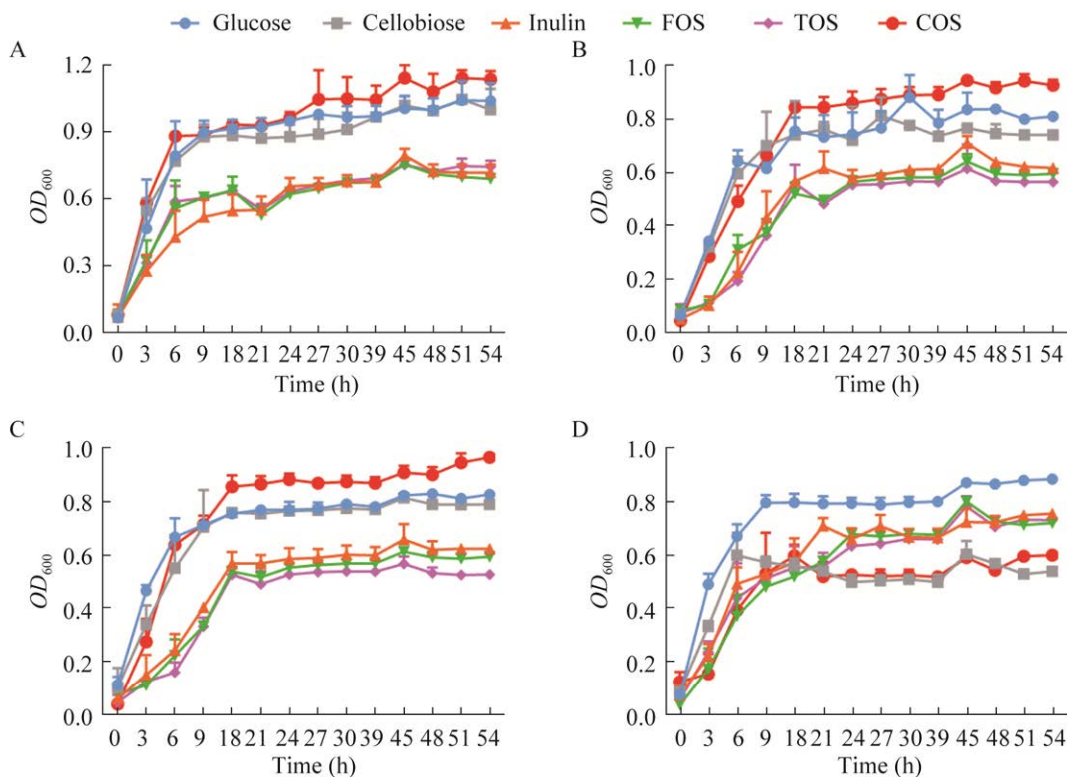


图 6 不同益生元对益生菌株生长的影响

Figure 6 Effect of different prebiotics on the growth of probiotic strains. A: *Lactobacillus casei*. B: *Lactobacillus acidophilus*. C: *Lactobacillus paracasei*. D: *Bifidobacterium longum*. The background color of the medium was removed and the growth curve was normalized. All the measurements were carried out in triplicate.

### 3 讨论与结论

本研究通过多酶法催化来高效生产纤维寡糖,并利用生产的纤维寡糖来促进肠道益生菌的生长。降解纤维素的微生物(例如纤维素分解菌、热梭杆菌等)体内存在水解酶或磷酸化酶,它们可以摄取外界的纤维素或低聚糖到细胞内,在那里将其水解或磷酸化后再进行代谢<sup>[30]</sup>。因此,我们将磷酸化酶在大肠杆菌中进行异源表达,后续通过对几种酶的共表达来实现纤维寡糖的生产。除此之外,本研究还证明了益生菌与不同益生元(纤维寡糖、低聚木糖、低聚果糖和菊粉)的组合可以显著提升益生菌的生长。益生元调节肠道内部的菌群向益生菌的富集方向发展,进而促进肠道健康,这也表明益生菌在肠道内部的生长能力和状况至关重要<sup>[31]</sup>。纤维寡糖能有效地促进益生菌的增殖,但是不同益生菌对不同益生元的选择作用可能是因为益生菌体内部存在专一的低聚糖( $\beta$ -1,3 或  $\beta$ -1,4)类物质摄取系统<sup>[32-33]</sup>,摄取系统的特异性决定了微生物在不同低聚糖刺激下菌体生长的效率。在之前的研究中<sup>[34]</sup>,通过对乳酸菌或嗜酸菌等的全基因组测序发现了多种用于分解代谢低聚糖的基因及转运蛋白,乳酸菌属通过细胞膜上 ABC 转运蛋白进入胞内,之后通过胞内的糖苷水解酶(GH)将低聚糖水解后进行利用,但是这些益生菌株对纤维寡糖的利用效率不同可能与非特异性转运体介导的非特异性摄取有关<sup>[35]</sup>。综上所述,目前的研究表明聚合度 2-6 的可溶性纤维寡糖具有显著促进益生菌生长的潜力,它还证明了利用廉价底物葡萄糖和蔗糖通过多级酶联法高效生产高纯度纤维寡糖的可能性。

#### REFERENCES

- [1] 王朋凯, 张雁, 池建伟, 黄菲, 魏振承. 纤维低聚糖的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2017, 17(6): 136-141.
- [2] WANG PK, ZHANG Y, CHI JW, HUANG F, WEI ZC. Investigation progress of cello-oligosaccharides[J]. Storage and Process, 2017, 17(6): 136-141 (in Chinese).
- [3] LEBLANC JG, CHAIN F, MARTÍN R, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, COURAU S, LANGELLA P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria[J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 1-10.
- [4] MUSSATTO SI, MANCILHA IM. Non-digestible oligosaccharides: a review[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 68(3): 587-597.
- [5] TESTER RF, AL-GHAZZEWI FH. Role of prebiotics and probiotics in oral health[J]. Nutrition & Food Science, 2018, 48(1): 16-29.
- [6] WHISNER CM, CASTILLO LF. Prebiotics, bone and mineral metabolism[J]. Calcified Tissue International, 2018, 102(4): 443-479.
- [7] UBIPARIP Z, MORENO DS, BEERENS K, DESMET T. Engineering of cellobiose phosphorylase for the defined synthesis of cellotriose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(19): 8327-8337.
- [8] VIEIRA AT, TEIXEIRA MM, MARTINS FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity[J]. Frontiers in Immunology, 2013, 4: 445.
- [9] 沈雪亮. 功能性纤维低聚糖的研究现状及发展前景[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(8): 100-104.
- [10] SHEN XL. Current research and advance prospect of functional cello-oligosaccharide[J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(8): 100-104 (in Chinese).
- [11] MANO MCR, NERI-NUMA IA, SILVA JB, PAULINO BN, PESSOA MG, PASTORE GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 17-37.
- [12] KOTHARI D, PATEL S, GOYAL A. Therapeutic spectrum of nondigestible oligosaccharides: overview of current state and prospect[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(8): R1491-R1498.
- [13] BAI SW, YANG LZ, WANG HL, YANG C, HOU XC, GAO JJ, ZHANG ZM. Cellobiose phosphorylase from *Caldicellulosiruptor bescii* catalyzes reversible phosphorolysis via different kinetic mechanisms[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 3978.

- [12] HE XX, LU W, SUN CX, KHALES I H, MATA A, ANDALEEB R, FANG YP. Cellulose and cellulose derivatives: different colloidal states and food-related applications[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 255: 117334.
- [13] DEBIAGI F, MADEIRA TB, NIXDORF SL, MALI S. Pretreatment efficiency using autoclave high-pressure steam and ultrasonication in sugar production from liquid hydrolysates and access to the residual solid fractions of wheat bran and oat hulls[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 190(1): 166-181.
- [14] BARBOSA FC, SILVELLO MA, GOLDBECK R. Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production[J]. Biotechnology Letters, 2020, 42(6): 875-884.
- [15] PARISUTHAM V, CHANDRAN SP, MUKHOPADHYAY A, LEE SK, KEASLING JD. Intracellular cellobiose metabolism and its applications in lignocellulose-based biorefineries[J]. Bioresource Technology, 2017, 239: 496-506.
- [16] REICHENBECHER M, LOTTSPEICH F, BRONNENMEIER K. Purification and properties of a cellobiose phosphorylase (*CepA*) and a cellodextrin phosphorylase (*CepB*) from the cellulolytic thermophile *Clostridium stercorarium*[J]. European Journal of Biochemistry, 1997, 247(1): 262-267.
- [17] DEVENDRAN S, ABDEL-HAMID AM, EVANS AF, IAKIVIAK M, KWON IH, MACKIE RI, CANN I. Multiple cellobiohydrolases and cellobiose phosphorylases cooperate in the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 8 to degrade cellooligosaccharides[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35342.
- [18] KITAOKA M, SASAKI T, TANIGUCHI H. Phosphorolytic reaction of *Cellvibrio gilvus* cellobiose phosphorylase[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(4): 652-655.
- [19] TIAN CG, BEESON WT, IAVARONE AT, SUN JP, MARLETTA MA, CATE JHD, GLASS NL. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22157-22162.
- [20] SANTOS SALGADO JC, MELEIRO LP, CARLI S, WARD RJ. Glucose tolerant and glucose stimulated  $\beta$ -glucosidases-a review[J]. Bioresource Technology, 2018, 267: 704-713.
- [21] NAKAI H, ABOU HACHEM M, PETERSEN BO, WESTPHAL Y, MANNERSTEDT K, BAUMANN MJ, DILOKPIMOL A, SCHOLS HA, DUUS JØ, SVENSSON B. Efficient chemoenzymatic oligosaccharide synthesis by reverse phosphorolysis using cellobiose phosphorylase and cellodextrin phosphorylase from *Clostridium thermocellum*[J]. Biochimie, 2010, 92(12): 1818-1826.
- [22] ZHONG C, DUIĆ B, BOLIVAR JM, NIDETZKY B. Three-enzyme phosphorylase cascade immobilized on solid support for biocatalytic synthesis of cello-oligosaccharides[J]. ChemCatChem, 2020, 12(5): 1350-1358.
- [23] 刘伟丰, 陶勇. 蛋白质预算: 合成生物学的成本标尺[J]. 生物工程学报, 2013, 29(8): 1123-1132.
- LIU WF, TAO Y. Protein budget: cost estimating criteria for synthetic biology[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(8): 1123-1132 (in Chinese).
- [24] WANG L, ZHENG P, HU MR, TAO Y. Inorganic phosphate self-sufficient whole-cell biocatalysts containing two co-expressed phosphorylases facilitate cellobiose production[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2022, 49(3): kuac008.
- [25] CERDOBBEL A, de WINTER K, AERTS D, KUIPERS R, JOOSTEN HJ, SOETAERT W, DESMET T. Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by a combination of sequence- and structure-based mutagenesis[J]. Protein Engineering, Design and Selection, 2011, 24(11): 829-834.
- [26] WU YY, MAO GT, FAN HY, SONG AD, ZHANG YH P, CHEN HG. Biochemical properties of GH94 cellodextrin phosphorylase THA\_1941 from a thermophilic eubacterium *Thermosipho africanus* TCF52B with cellobiose phosphorylase activity[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 4849.
- [27] ZHONG C, LULEY-GOEDL C, NIDETZKY B. Product solubility control in cellooligosaccharide production by coupled cellobiose and cellodextrin phosphorylase[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(9): 2146-2155.
- [28] XU YM, WU YK, LV XQ, SUN GY, ZHANG HZ, CHEN TC, DU GC, LI JH, LIU L. Design and construction of novel biocatalyst for bioprocessing: recent advances and future outlook[J]. Bioresource Technology, 2021, 332: 125071.
- [29] KATANANO H, NOBA S, SATO K, KIMOTO H.

- Solubility-based separation and purification of long-chain chitin oligosaccharides with an organic-water mixed solvent[J]. *Analytical Sciences*, 2017, 33(5): 639-642.
- [30] DESVAUX M. Unravelling carbon metabolism in anaerobic cellulolytic bacteria[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(5): 1229-1238.
- [31] ZARTL B, SILBERBAUER K, LOEPPERT R, VIERNSTEIN H, PRAZNIK W, MUELLER M. Fermentation of non-digestible raffinose family oligosaccharides and galactomannans by probiotics[J]. *Food & Function*, 2018, 9(3): 1638-1646.
- [32] ABOULOIFA H, KHODAEI N, ROKNI Y, KARBOUNE S, BRASCA M, D'HALLEWIN G, BEN SALAH R, SAALAOU E, ASEHRAOU A. The prebiotics (fructo-oligosaccharides and xylo-oligosaccharides) modulate the probiotic properties of *Lactiplantibacillus* and *Levilactobacillus* strains isolated from traditional fermented olive[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 36(12): 1-12.
- [33] ABOU HACHEM M, ANDERSEN JM, BARRANGOU R, MØLLER MS, FREDSLUND F, MAJUMDER A, EJBY M, LAHTINEN SJ, JACOBSEN S, LO LEGGIO L, GOH YJ, KLAENHAMMER TR, SVENSSON B. Recent insight into oligosaccharide uptake and metabolism in probiotic bacteria[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2013, 31(4): 226-235.
- [34] GOH YJ, KLAENHAMMER TR. Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2015, 6: 137-156.
- [35] TASSE L, BERCOVICI J, PIZZUT-SERIN S, ROBE P, TAP J, KLOPP C, CANTAREL BL, COUTINHO PM, HENRISSAT B, LECLERC M, DORÉ J, MONSAN P, REMAUD-SIMEON M, POTOCKI-VERONESE G. Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes[J]. *Genome Research*, 2010, 20(11): 1605-1612.

(本文责编 郝丽芳)