

研究报告

灵芝 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶酶学性质研究及其应用

顾榕^{1,2}, 赵丽婷^{1,2}, 顾正华^{1,2}, 李由然^{1,2}, 石贵阳^{1,2}, 丁重阳^{*1,2}

1 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

顾榕, 赵丽婷, 顾正华, 李由然, 石贵阳, 丁重阳. 灵芝 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶酶学性质研究及其应用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4090-4103

Gu Rong, Zhao Liting, Gu Zhenghua, Li Youran, Shi Guiyang, Ding Zhongyang. Expression and characterization of the UDP-glucose 4-epimerase from *Ganoderma lingzhi*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4090-4103

摘要: 【背景】灵芝多糖是灵芝的重要活性物质之一。UDP-葡萄糖 4-差向异构酶(UDP-glucose 4-epimerase, UGE, EC 5.1.3.2)是灵芝多糖合成途径中糖供体生成的重要酶, 其参与了 UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖的相互转化, 与多糖中半乳糖残基含量密切相关。【目的】通过对来源于灵芝的 UGE 基因进行异源表达, 丰富灵芝多糖糖供体合成途径重要酶的酶学特性信息, 深入了解灵芝多糖代谢合成途径。【方法】以灵芝菌株(*Ganoderma lingzhi*) CGMCC 5.26 的 cDNA 为模板, 克隆得到 UGE 基因 *GL30389*, 并在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中诱导表达, 产物纯化后进行酶学性质、酶动力学、底物专一性及转化率的研究。【结果】灵芝 UGE 的分子量为 45 kDa。最适反应 pH 值为 6.0, 在 pH 7.0–9.0 范围内有较好的稳定性; 最适反应温度为 30 °C, 温度在 40 °C 时稳定性最好。Fe²⁺ 和 Mg²⁺ 对 UGE 有激活作用。以 UDP-葡萄糖为底物时, K_m 为 0.824 mmol/L, V_{max} 为 769.230 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, k_{cat} 为 1.333 s⁻¹, k_{cat}/K_m 为 1.618 L/(mmol·s)。灵芝 UGE 对 D-葡萄糖、半乳糖醛酸及 N-乙酰葡萄糖胺有催化活性。通过优化 pH、温度、底物与酶的配比、添加金属离子将转化率从 16.0% 提升至 39.4%。【结论】灵芝 UGE 与植物来源的 UGE 酶学性质较为相似, 其催化效率优于大部分细菌来源的 UGE。本研究丰富了灵芝多糖糖供体合成途径重要酶的酶学特性信息, 有利于深入了解灵芝多糖代谢合成途径。

关键词: 灵芝; UDP-葡萄糖 4-差向异构酶; 酶学性质; 底物专一性; 转化率

*Corresponding author: E-mail: bioding@163.com

Received: 2022-02-12; Accepted: 2022-03-28; Published online: 2022-04-21

Expression and characterization of the UDP-glucose 4-epimerase from *Ganoderma lingzhi*

GU Rong^{1,2}, ZHAO Liting^{1,2}, GU Zhenghua^{1,2}, LI Youran^{1,2}, SHI Guiyang^{1,2},
DING Zhongyang^{*1,2}

1 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Ganoderma lingzhi* polysaccharides (GLP) are the main active component of this mushroom. UDP-glucose 4-epimerase (UGE, EC 5.1.3.2), an essential enzyme in the generation of sugar donor in synthesis of GLP, catalyzes the interconversion of UDP-glucose and UDP-galactose and thus is closely related to the content of galactose residue in GLP. **[Objective]** Through heterologous expression of the UGE gene from *G. lingzhi*, this study aims to further explore the enzymatic properties of important enzymes in the generation of sugar donor in GLP synthesis and gain a clearer insight into the synthesis pathway of GLP. **[Methods]** With the cDNA of *G. lingzhi* CGMCC 5.26 as template, UGE gene was cloned and then expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The yielded recombinant enzyme was then purified and the enzymatic properties and kinetics, substrate specificity, and conversion rate of the purified enzymes were investigated. **[Results]** The recombinant enzyme was 45 kDa. The optimum reaction pH was 6.0, and it was stable at pH 7.0–9.0. The optimum temperature was 30 °C, and it was most stable at 40 °C. Fe²⁺ and Mg²⁺ could activate UGE. With UDP-glucose as substrate, the enzyme had the K_m of 0.824 mmol/L, V_{max} of 769.230 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, k_{cat} of 1.333 s^{-1} , and k_{cat}/K_m of 1.618 $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$. It catalyzed D-glucose, galacturonic acid, and N-acetylglucosamine. The conversion rate was increased from 16.0% to 39.4% at the optimal pH, temperature, and ratio of substrate with the addition of metal ions. **[Conclusion]** UGE from *G. lingzhi* has similar enzymatic properties to plants-derived UGE, and the catalytic efficiency was higher than most of the UGEs from bacteria. This study enriches the enzymatic properties of important enzymes involved the sugar donor synthesis in GLP production, which helps enhance the understanding of GLP synthesis pathway.

Keywords: *Ganoderma lingzhi*; UDP-glucose 4-epimerase; enzymatic properties; substrate specificity; conversion rate

灵芝隶属于担子菌门伞菌纲多孔菌目灵芝科灵芝属, 是一种食用药物真菌, 最早记载于汉代的《神农本草经》中, 具有很高的药用价值和营养价值^[1]。

灵芝多糖是灵芝的重要活性物质之一, 目前人们已分离出 200 多种灵芝多糖^[2]。灵芝多糖是一种大分子化合物, 多为杂多糖, 具有抗

氧化、抗肿瘤、免疫调节及调节肠道菌群等多种生物活性^[2]。灵芝多糖的常见单糖组分为葡萄糖、半乳糖、甘露糖。其中葡萄糖占主要部分, 半乳糖的比例为 1%–10%^[3]。因此, 对 UDP-半乳糖的合成途径及其相关酶的研究能对灵芝多糖生物合成途径有更深入的理解。

UDP-葡萄糖 4-差向异构酶(UDP-glucose

4-epimerase, UGE)作为灵芝多糖前体合成的重要酶,参与了UDP-葡萄糖与UDP-半乳糖之间的相互转化(图1)^[4]。研究表明 UGE 能平衡和调节核苷酸糖的水平^[5-7],这对多糖中单糖组成比例的变化与调控也具有潜在的影响。目前关于 UGE 的研究主要集中在细菌、植物来源,在食用药物真菌中的报道较少,尚无关于灵芝来源 UGE 的相关研究。本文对来源于灵芝的 UGE 基因进行挖掘和异源表达,通过对酶学性质、酶动力学等方面的分析,以期进一步丰富此类酶的酶学特性信息,同时加深对灵芝多糖代谢合成途径的了解。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基

大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3)和高效非融合、可溶的 pTIG-Trx 表达载体由本实验室保藏。灵芝菌株 CGMCC 5.26 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),由本实验室保藏。

LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,氯化钠 10.0,

酵母提取物 5.0。

TB 培养基(g/L): 酵母提取物 24.0, 蛋白胨 12.0, 磷酸氢二钾 9.4, 磷酸二氢钾 2.2, 甘油 8 mL。

1.1.2 主要试剂和仪器

UDP-葡萄糖,上海源叶生物科技有限公司;UDP-半乳糖及其他单糖,上海麦克林生化科技有限公司。酶标仪,TECAN 公司;台式高速离心机, Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司;PCR 仪和核酸凝胶电泳仪, Bio-Rad 公司;蛋白纯化仪,苏州赛谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝 UGE 基因的挖掘

在 NCBI 网站获取灵芝全基因组 cDNA 的核苷酸序列。在 KEGG 网站检索“GalE”,获取该酶的 EC 编号。采取全基因功能注释法,通过全基因组序列比对,找出不同物种间的相似区域,再利用 EC 编号搜索特定功能的基因,实现基因的挖掘。具体流程如下:选择 KEGG Automatic Annotation Server (KAAS) 网站 (<http://www.genome.jp/tools/kaas/>) 上 Complete or Draft Genome 的 KAAS job request (BBH method, 双向最佳匹配法)功能。输入灵芝全基因组序列, assignment method 选择 BBH, 并从

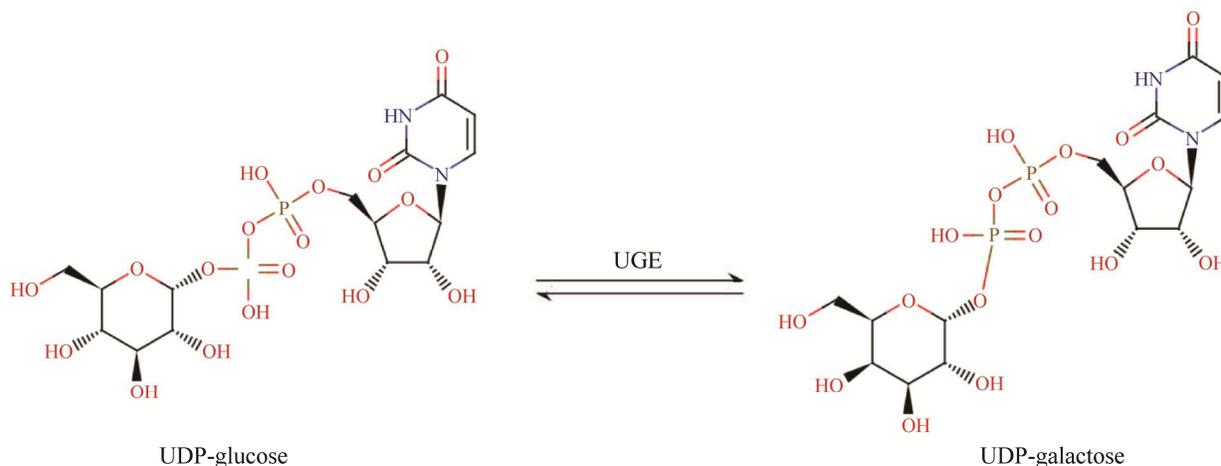


图1 UGE 介导的 UDP-葡萄糖与 UDP-半乳糖的可逆反应

Figure 1 UGE-mediated reversible reaction of UDP-glucose with UDP-galactose.

selected organisms 中选择 40 种真菌来源的生物进行比对(与灵芝来源相近), 点击 compute, 得到基因 ID 号-KO 编号的表格。再与从 KEGG 下载的 KO 编号-EC 编号表进行比对, 对应得到基因 ID 号-EC 编号的表格, 找到 EC 编号为 5.1.3.2 (UGE)对应的基因 ID 号。

1.2.2 灵芝 RNA 的提取及灵芝 UGE 基因的扩增

提取灵芝 RNA, 将其反转录为 cDNA 作为扩增模板。利用软件 CmSuite8 设计目的基因 UGE 的上游引物 F (5'-CGGAATTCTAATGTCGG AACTCAAACGAGTG-3')和下游引物 R (5'-CC AAGCTTGTCGGTATCGTACCCCTTGG-3'), 在上、下游引物 5'-端分别加入 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点, 并添加保护碱基。扩增得到 *GL30389* 基因。

1.2.3 重组菌的构建和筛选

将扩增得到的 UGE 基因 *GL30389* 切胶回收并纯化。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 内切酶对胶回收后的 UGE 基因片段和 pTIG 表达质粒进行双酶切, 连接后构建重组质粒 pTIG-UGE。将重组质粒转化至 *E. coli* JM109 感受态中, 提取质粒双酶切, 测序验证正确后转化至 *E. coli* BL21(DE3)中表达, 培养 1 h 后将重组菌 pTIG-UGE/BL21(DE3)、对照菌 pTIG/BL21(DE3)分别涂布于 100 mg/L 的 Amp 抗性平板上, 37 °C 倒置培养 12 h, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 再将条带大小与目的条带理论长度相近的转化子送公司测序, 筛选出阳性转化子。

1.2.4 灵芝 UGE 基因在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的诱导表达

挑取测序正确的重组 pTIG-UGE 单菌落及 pTIG 空质粒(对照)接种于 20 mL 的 LB 液体培养基中, 在 37 °C、200 r/min 的条件下培养 12 h, 再以 2%的转接量转接至 50 mL 的 TB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时,

添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 在 16 °C、200 r/min 条件下诱导 24 h, 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃上清收集菌体。用 Tris-HCl (pH 8.0)洗涤菌体 3 次。最后加入适量的 Tris-HCl 缓冲液, 在功率为 300 W、工作时间 8 min、工作 1 s 停 2 s 的超声条件下破碎, 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min, 弃不溶细胞碎片, 上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 得到粗酶液。

1.2.5 酶活力的检测

采用高效液相色谱法^[8]测定底物 UDP-葡萄糖和产物 UDP-半乳糖含量, 计算酶活力。高效液相色谱条件: Dionex CarboPac PA10 色谱柱; Dionex CarboPac PA10 保护柱; 柱温 30 °C; 流速 1 mL/min; 进样量 25 μL。流动相为 2 mmol/L NaOH 溶液与 1 mol/L NaAc 溶液。检测器为紫外可见光检测器; 检测波长为 262 nm。

酶活测定体系: 130 μL UDP-葡萄糖(终浓度为 1 mg/mL), 20 μL 纯酶液(终浓度为 0.5 mg/mL), 总体积为 150 μL。

反应条件: 在 30 °C 下孵育 10 min, 通过煮沸 5 min 终止反应。

酶活定义: 一个酶活力单位(1 U)定义为温度为 30 °C 和 pH 8.0 条件下, 在 1 min 内转化 1 μmol 底物 UDP-葡萄糖所需的酶量。

1.2.6 蛋白纯化及其分析

利用镍柱对 pTIG-UGE 的粗酶液进行纯化, 收集纯化后的酶液, 经超滤管浓缩处理后, 使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)对其进行鉴定。

1.2.7 酶学性质

反应体系均为纯酶 20 μL, Tris-HCl 缓冲溶液 100 μL (pH 8.0), 底物 UDP-葡萄糖(1 mg/mL) 80 μL。反应条件为 30 °C 反应 10 min, 每个条件设置 3 个平行。

(1) UGE 的最适反应 pH 及 pH 的稳定性: 测定相同温度、不同 pH 条件下 UGE 纯酶的酶活力。将最高酶活力设为 100%, 计算出不同 pH 条件下的相对酶活。测定相同温度不同 pH 条件下孵育 1 h 后的残余酶活力, 以最高酶活力设为 100%, 计算不同 pH 条件下的残余酶活, 探究 pH 稳定性。

(2) UGE 的最适反应温度及温度稳定性: 测定最适 pH 时不同温度条件下 UGE 纯酶的酶活力。将最高酶活力设为 100%, 同上述方法探究温度稳定性。

(3) 金属离子、有机溶剂、抑制剂对酶活的影响: 测定最适 pH、温度时添加不同金属离子、有机溶剂、抑制剂后的酶活力。将不添加金属离子、有机溶剂、抑制剂的样品作为对照组, 酶活设为 100%。根据酶活力倍数计算出实验组的相对酶活。

(4) 动力学相关常数测定: 测定最适反应条件时不同底物(UDP-葡萄糖)浓度下 UGE 的酶活力, 并对应计算反应速率。以底物浓度(S)为 X 轴, 反应速率(V)为 Y 轴, 作出反应速率随底物浓度变化的曲线。使用双倒数法, 作出 $1/V$ 随 $1/S$ 变化的线性图。根据截距与斜率, 计算 UGE 的 K_m 、 k_{cat} 、 V_{max} 及 k_{cat}/K_m 值。

1.2.8 底物专一性研究

分别将 D-葡萄糖、D-半乳糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、D-阿拉伯糖、D-木糖、N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰半乳糖胺作为反应底物, 体系同上。条件为 30 °C 反应 10 min, 通过高效液相色谱对底物与产物进行定量测定。

1.2.9 提高反应转化率的研究

(1) pH 和温度对酶反应转化率的影响: 在不同 pH (根据最适反应 pH 及 pH 稳定性) 和不同温度(根据最适反应温度及温度稳定性)条件下, 分别测定随着反应时间的延长生成物浓度

的变化, 分析 pH 和温度对酶反应热力学的影响。

(2) 最适金属离子浓度测定: 根据酶学性质中不同金属离子对酶活力的影响, 选取对酶活力有促进作用的金属离子。添加不同浓度的金属离子, 根据转化率判断有促进作用金属离子对酶转化率的最适浓度。

(3) 底物与酶浓度对酶转化率的影响: 利用控制变量法, 分别测定一定时间内不同底物浓度、酶浓度、底物/酶配比条件下反应的转化率, 寻找最优的底物浓度和酶浓度条件。

2 结果与分析

2.1 灵芝 UGE 基因的克隆及重组菌的获得

采取全基因注释法对灵芝全基因组 cDNA 进行注释, 最终得到一条基因序列 *GL30389*。该基因全长为 1 119 bp, 编码 372 个氨基酸, 理论分子量为 41 kDa。将基因片段 pTIG-*GL30389* 与 pTIG 表达载体连接后构建重组质粒 pTIG-UGE (图 2), 转化至 *E. coli* 后挑取单菌落进行菌落 PCR 验证(图 3), 测序筛选阳性转化子, 成功得到重组质粒 pTIG-UGE。

2.2 重组质粒的诱导表达、酶活力检测及纯化

将重组菌株 pTIG-UGE(BL21)经 IPTG 诱导表达目的蛋白 UGE, 得到粗酶液。使用镍柱对粗酶液进行纯化。如图 4 所示, 1、2 均为 pTIG-*GL30389* 粗酶液经过镍柱纯化后的酶液, 在 45 kDa 处有明显的重组蛋白条带, 条带清晰且无杂带, 与理论条带分子量大小加上 His 标签的蛋白分子量(42.5 kDa)相似, 证明成功表达。经过镍柱纯化后酶液的比酶活为 0.7 U/mg。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性

如图 5 所示, UGE 的最适反应 pH 值为 6.0, 该条件下保温 1 h 剩余酶活为 70%。该酶在酸

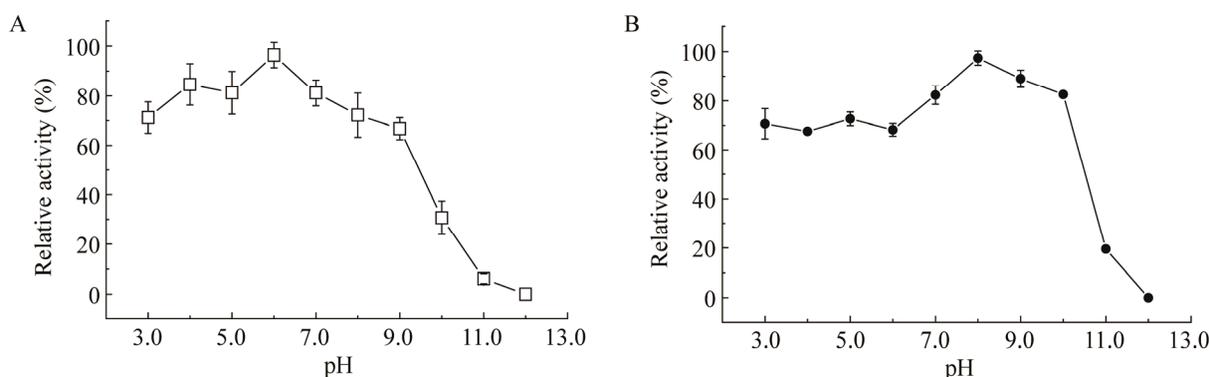


图5 pH对酶活力的影响及稳定性的研究 A: UGE的最适pH; B: UGE的pH稳定性

Figure 5 Effect of pH on enzyme activity and stability. A: Optimum pH of UGE; B: pH stability of UGE.

性环境下酶活力较高且稳定;碱性环境下酶活力较低,但pH值在7.0–9.0时稳定性高于酸性条件。这表明该酶pH耐受范围较广,既耐酸也耐碱。不同来源UGE的最适pH值集中在7.0–9.0之间,pH值也是在7.0–9.0之间稳定性最优。灵芝UGE的最适pH与其他来源相比偏小,具有更强的耐酸能力。稳定性在pH 8.0时最优。

2.3.2 最适反应温度和温度稳定性

如图6所示,UGE的最适反应温度是30℃。当温度小于30℃时相对酶活随着温度的降低而减小,当温度为20℃时,相对酶活仍保持在70%以上;当温度大于30℃时,相对酶活随着温度的升高而减小;当温度升高到60℃时,相对酶活依旧能保持在50%以上。

UGE在不同温度下保温1h后测定的剩余酶活如图6B所示。UGE在35–40℃时最为稳定,当温度低于40℃时,相对酶活随着温度的降低逐渐减小;当温度为20℃时,相对酶活还能保持在65%以上;当温度高于40℃时,相对酶活随着温度的升高而降低,但是相对酶活在60℃时仍能保持在55%以上。

对不同来源UGE酶学性质的比较显示,动物、细菌来源的最适温度会略高于植物来源,部分嗜热菌的最适温度明显高于此范围。灵芝

UGE的最适温度和温度稳定性较符合植物来源UGE的特性。

2.3.3 金属离子及有机溶剂对酶活性的影响

不同金属离子对UGE活性的影响各不相同,不同浓度的金属离子对UGE活性的影响也有很大差异。如图7A所示,低浓度的 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 可提高UGE的酶活力,而其他金属离子均会抑制酶活力,其中 Cu^{2+} 抑制作用最明显,而且 Cu^{2+} 浓度越高,抑制能力越强, Mn^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 及低浓度的 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 对酶的抑制作用不明显。

如图7B所示,当加入5%的正丙醇和甲醇时,酶活高于对照组,而其他有机试剂均对酶活力有抑制作用,但抑制作用不明显,说明UGE对有机试剂耐受力较强。

2.3.4 抑制剂对酶活性的影响

如图8所示,当加入0.1 mmol/L的二巯苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF),相对酶活还能保持在80%以上;当加入0.5 mmol/L DTT、EDTA和PMSF时,相对酶活下降至50%以下。说明较高浓度的DTT和EDTA对酶活损害较大。

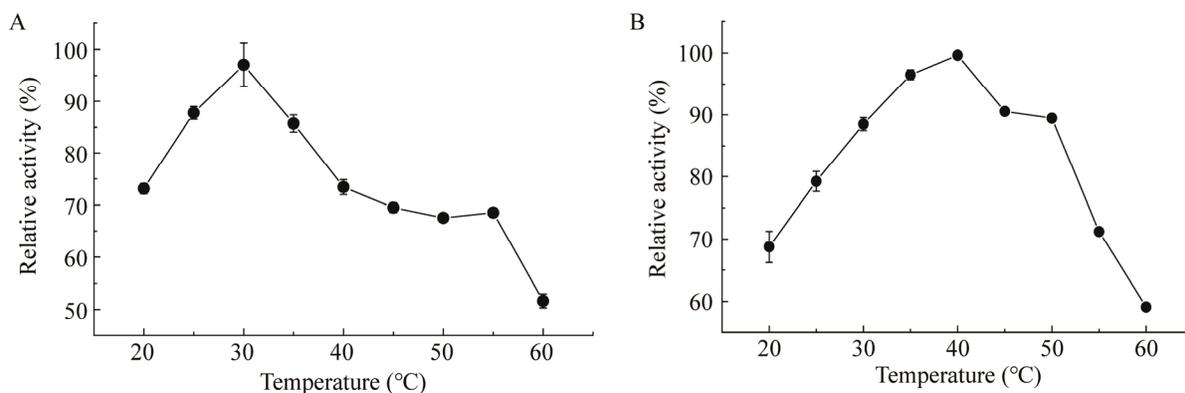


图 6 温度对酶活力的影响及稳定性的研究 A: UGE 的最适温度; B: UGE 的温度稳定性
 Figure 6 Effect of temperature on enzyme activity and stability. A: Optimum temperature of UGE; B: Temperature stability of UGE.

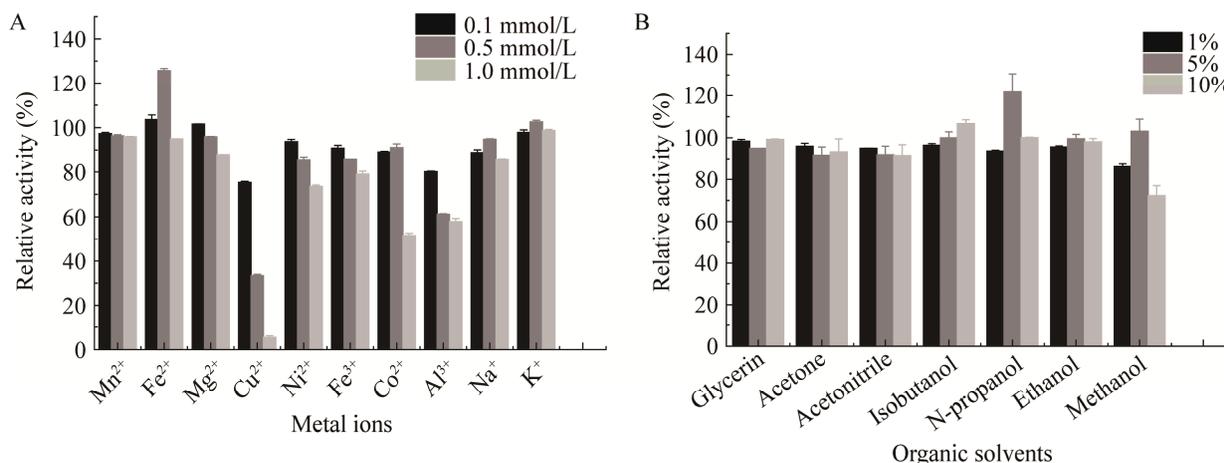


图 7 金属离子及有机溶剂对酶活力的影响 A: 金属离子对酶活力的影响; B: 有机溶剂对酶活力的影响
 Figure 7 Effect of metal ions and organic solvents on enzyme activity. A: Effect of metal ions on UGE; B: Effect of organic solvents on UGE.

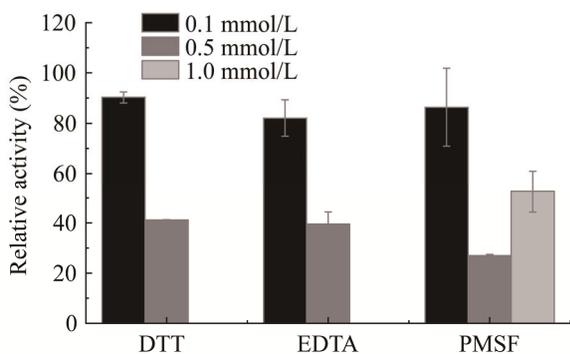


图 8 抑制剂对酶活力的影响
 Figure 8 Effect of inhibitors on enzyme activity.

2.3.5 影响酶反应动力学的研究

根据计算得出 UGE 的米氏常数 K_m 为 0.824 mmol/L, 反应最大速率 V_{max} 为 769.230 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, 催化常数 k_{cat} 为 1.333 s^{-1} , 催化效率指数 k_{cat}/K_m 为 1.618 $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ 。水稻 (*Oryza sativa* var. Nipponbare)^[9]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[10]、蕨类 (*Davallia divaricate*)^[11]、豌豆 (*Pisum sativum* L. cv. Wando)^[12] 等植物来源的 UGE 普遍比细菌来源的 UGE 对底物 (UDP-葡萄糖或 UDP-半乳糖) 的亲合力高。灵芝 UGE 对

UDP-葡萄糖的亲合力与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)相近^[10], 稍低于其他植物来源的 UGE, 但相较于大部分细菌具有更高的亲和性。

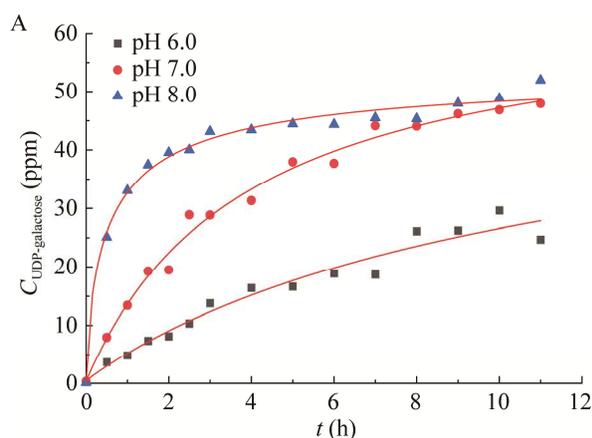
2.4 底物专一性探究

研究表明 UGE 对部分游离单糖, 如 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖和 D-塔罗糖等也有催化能力, 酶活性一般介于 0.3–9.7 nmol/(mg·min)^[13]。该酶的底物广谱性研究结果表明 UGE 对 D-半乳糖、葡萄糖醛酸、N-乙酰半乳糖胺、D-阿拉伯糖、D-木糖无催化能力, 对 D-葡萄糖、半乳糖醛酸、N-乙酰葡萄糖胺有催化能力。其中以 N-乙酰葡萄糖胺为底物, 反应 10 min 的转化率为 1.9%。

2.5 提高 UGE 反应转化率的研究

2.5.1 pH 和温度对 UGE 反应热力学的影响

pH 和温度是 UGE 反应热力学的重要因素, 会影响 UGE 反应的转化率。根据酶学性质中 UGE 反应的最适 pH 值为 6.0, pH 8.0 时稳定性最优, 因此, 将 pH 6.0、7.0、8.0 对反应热力学的影响展开研究。由图 9 可知, pH 改变影响了酶促反应的平衡常数。pH 从 6.0 提升至 8.0, 转化率从 16.0% 提高到了 22.4%。



根据酶学性质对 30、40、50 °C 展开研究。温度为 30 °C 时达到平衡状态的时间最快, 约 4 h 达到平衡, 而且 2 h 的转化率为 27.3%, 远高于 35 °C 和 40 °C; 35 °C 达到平衡状态的时间次之, 40 °C 达到平衡状态的时间最长。因此 pH 8.0、30 °C 是转化的最优条件, 此时的转化率能提升为 30.9%。

2.5.2 金属离子浓度对转化率的影响

因为酶学性质中 Mg^{2+} 与 Fe^{2+} 可提高 UGE 的酶活力, 所以开展了这 2 种金属离子对酶转化率影响的研究。由图 10 可知, 随着 Mg^{2+} 浓度的增加, 转化率逐渐降低。低浓度的 Fe^{2+} 可提高转化率, 而高浓度的 Fe^{2+} 则会显著抑制酶的活性。最适的 Fe^{2+} 添加浓度为 0.05 mmol/L, 最终转化率可以提升至 35.4%。

2.5.3 底物浓度、酶浓度对反应转化率的影响

由表 1 得知, 在一定的反应时间内, 底物浓度相同时, 酶浓度越高, 底物/酶的比值就越低, 转化率越高; 酶浓度相同时, 底物浓度越高, 底物/酶的比值越低, 转化率越高; 当底物浓度为 4.4 mg/mL, 酶浓度为 2.6 mg/mL 时, 转化率能达到最高, 为 39.4%。

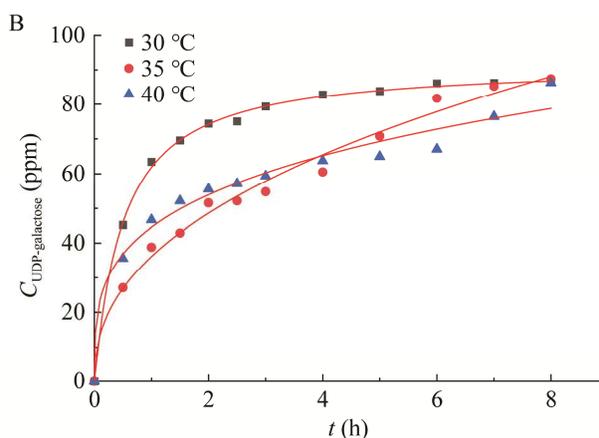


图 9 pH (A) 和温度 (B) 对 UGE 反应热力学的影响

Figure 9 Effect of pH (A) and temperature (B) on thermodynamics of UGE reaction.

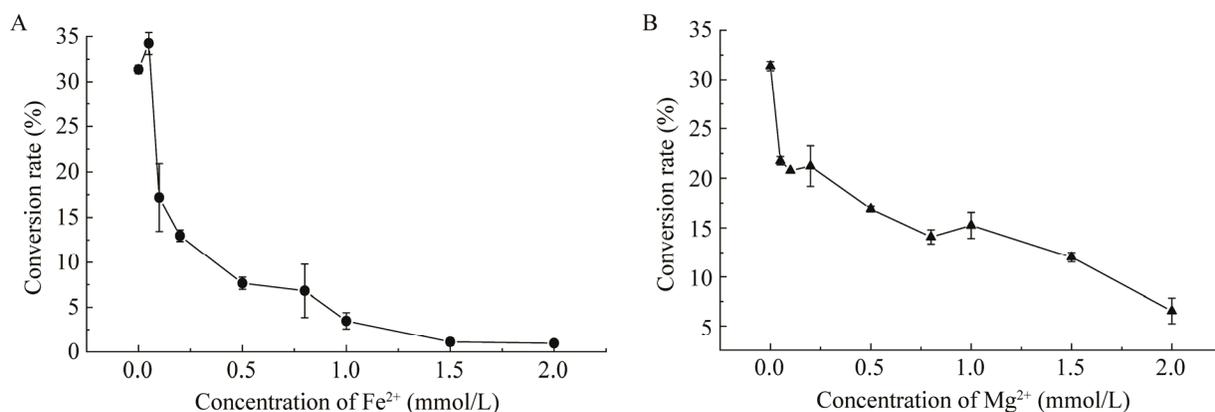


图 10 Fe²⁺ (A)和 Mg²⁺ (B)对 UGE 反应转化率的影响

Figure 10 Effect of Fe²⁺ (A) and Mg²⁺ (B) on the conversion rate of UGE reaction.

3 讨论与结论

目前关于 UGE 的研究主要集中在细菌、植物来源,对食用药物真菌的报道较少,尚无关于灵芝来源 UGE 的相关研究。灵芝 UGE 的最适 pH 值为 6.0, pH 8.0 时最为稳定。通过表 2 可知,UGE 的最适 pH 值范围为 7.0–9.0,物种之间差异性不大。灵芝 UGE 的最适 pH 值偏低,具有更强的耐酸能力,与 *Pyrococcus horikoshii*^[26] (pH 6.5)相近,低于大部分的植物、动物、细菌来源的 UGE。pH 会改变底物与酶的带电状态,影响酶与底物的特异性结合,从而改变酶活性及其稳定性。底物和酶分子在最适条件下最

易结合,酶活力及酶稳定性最好;底物和酶分子在其他条件下的结合能力下降,从而降低了酶活力和酶稳定性^[29]。

灵芝 UGE 最适温度为 30 °C,较为接近植物来源 UGE,略低于动物、细菌来源,而灵芝液态发酵温度通常也控制在 30 °C 最为适宜。当温度高于 30 °C 时,相对酶活随着温度的升高而迅速降低,但是相对酶活在 60 °C 时仍能保持在 55%以上,而热荚硫细菌(*Marinitoga piezophila*)^[19]、人体红细胞^[18]、蕨类(*Davallia divaricate*)^[11]来源的 UGE 在 60 °C 时已变性失活,表明灵芝 UGE 的耐高温能力较好。灵芝 UGE 在温度为 40 °C 时稳定性最好,在 35–45 °C 条件下保温 1 h 相对酶活均维持在 90%以上,在 60 °C 时相对酶活仍能保持在 60%左右,表明该酶的热稳定性较好,有利于应用于大规模的工业化生产中。生产过程中热量不断积累会造成反应体系温度升高,灵芝 UGE 则可降低热量因素导致的酶活力降低及失活的影响。

低浓度的 Fe²⁺、Mg²⁺可提高灵芝 UGE 的酶活力,因为这 2 种金属离子与 UGE 酶、UDP-葡萄糖形成了特殊的三元复合物,它们的存在有利于酶蛋白与底物的特异性结合,从而提高了

表 1 底物浓度、酶浓度对转化率的影响

Table 1 Effect of substrate concentration and enzyme concentration on conversion rate

| Entry | Substrate (mg/mL) | Biocatalyst (mg/mL) | S/C (g/g) | Conversion (%) |
|-------|-------------------|---------------------|-----------|----------------|
| 1 | 2.2 | 0.3 | 7.3 | 22.5 |
| 2 | 2.2 | 0.6 | 3.7 | 25.5 |
| 3 | 2.2 | 1.2 | 1.8 | 35.4 |
| 4 | 4.4 | 0.6 | 7.3 | 25.6 |
| 5 | 4.4 | 1.2 | 3.7 | 26.7 |
| 6 | 4.4 | 2.6 | 1.8 | 39.4 |
| 7 | 1.1 | 0.3 | 3.7 | 25.7 |
| 8 | 0.5 | 0.3 | 1.8 | 26.1 |

表 2 不同来源 UGE 的动力学参数及酶学信息

Table 2 Kinetic parameters and enzymatic information of UGE from different sources

| Sources | Species | Substrate | K_m (mmol/L) | V_m (mmol/(L·min)) | k_{cat} (min ⁻¹) | Optimum pH | Optimum temperature (°C) |
|--|--|------------|-------------------|---|-----------------------------------|------------|--------------------------------|
| Plants/ rice | <i>Oryza sativa</i> var. <i>Nipponbare</i> ^[9] | UDP-Gal | 0.40; 3.20 | | | | |
| | <i>Arabidopsis thaliana</i> ^[10] | UDP-Glc | 0.76 | | | 7.0–9.0 | 30–40 |
| | <i>Davallia divaricate</i> ^[11] | UDP-Glc | 0.55; 0.79 | 6.82×10 ⁻⁹ ; 14.96×10 ⁻⁹ | 10.2; 22.2 | 8.5 | 30–40 |
| | | UDP-Gal | 0.03; 0.06 | 3.86×10 ⁻⁹ ; 10.71×10 ⁻⁹ | 6; 16.2 | | 10–40 |
| | <i>Pisum sativum</i> L. cv. Wando ^[12] | UDP-Glc | 0.31 | | | 8.5 | 30–40 |
| | | UDP-Gal | 0.29 | | | | |
| | | UDP-Ara | 0.16 | | | | |
| | | UDP-Xyl | 0.15 | | | | |
| | <i>Vicia faba</i> L. ^[14] | UDP-Glc | 0.25 | | | 9.5 | |
| | | UDP-Gal | 0.12 | | | | |
| Animals | <i>Oyster Magallana gigas</i> ^[15] | UDP-Gal | 1.60 | 0.27 | 134 | 8.5 | 16–40 |
| | <i>Trypanosoma cruzi</i> ^[16] | UDP-Gal | 0.114 | | | | |
| | <i>Capra hircus</i> ^[17] | UDP-Gal | 0.021 | 2.44 | | 8.0 | 40 |
| | Human ^[18] | UDP-Glc | | | | 9.5 | 37 |
| Bacteria | <i>Marinitoga piezophila</i> KA3 ^[19] | UDP-Glc | 0.76 | 1.19×10 ⁻⁸ | | 8.0 | 35–45 |
| | <i>Canmpylobacter jejuni</i> ^[20] | UDP-Glc | 0.78 | | | 9.5 | |
| | <i>E. coli</i> O86 ^[21] | UDP-Glc | 0.37 | | | | |
| | <i>E. coli</i> ER2566 ^[22] | UDP-Glc | 237 | | 0.33 | | |
| | <i>E. coli</i> K12 ^[23] | UDP-Glc | 1.20 | | 1 080 | 7.0 | 35 |
| | <i>Pyrobaculum calidifontis</i> ^[24] | UDP-Gal | 3.90 | | 50.4 | 7.0 | 90 |
| | <i>Thermus</i> spp. ^[25] | UDP-Gal | 0.258 | | 3.319 | 9.0 | 50 |
| | <i>Pyrococcus horikoshii</i> ^[26] | UDP-Gal | 0.40 | | | 6.5 | 65 |
| | | UDP-Glc | 1.20 | | | | |
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> ^[27] | UDP-Gal | 0.70 | | 1 728 | 8.0–9.0 | 37 |
| | <i>Bacillus anthracis</i> ^[8] | UDP-GlcNac | | | | 8.0 | 37 |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> ^[28] | UDP-Glc | 1.40 | 0.17 | | 9.0 | 37 | |
| | UDP-Gal | 0.54 | 0.18 | | | | |

催化活性^[29]。然而其他金属离子均会抑制灵芝 UGE 的酶活力,其中 Cu²⁺抑制能力最强,浓度很低时也会导致相对酶活的大幅下降,可能是 Cu²⁺与 UGE 酶中的氨基、吡啶基或者巯基结合,影响了其活性中心的结构。金属离子对不同来源 UGE 酶活力的影响也不相同, Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺对热荚硫 UGE 有激活作用^[19], Ca²⁺、Mg²⁺

对蕨类 UGE 有轻微的激活作用^[11]。其中 Mg²⁺对 UGE 的激活作用最常见,可能是由于差向异构化采取的是质子转移机制,这一机制认为半径≤0.08 nm 的二价金属离子对活性中心有稳定作用,而半径>0.08 nm 的二价金属离子对酶活性有抑制作用。二价金属离子与酶结合后,活性部位(疏水区)外露,离子半径越小,水合离子

半径越大, 越不易钻入到酶的凹陷区域, 底物则更容易与酶结合^[30-31]。

灵芝 UGE 的 K_m 为 0.824 mmol/L, V_{max} 为 769.230 $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, k_{cat} 为 1.333 s^{-1} , k_{cat}/K_m 为 1.618 $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$, 与植物来源的酶相近。不同来源 UGE 的 K_m 值存在较大差异, 植物来源的 K_m 值明显低于细菌来源。米氏常数 K_m 值越小, 酶与底物的亲和能力越强; K_m 值越大, 亲和能力越弱。本研究中灵芝 UGE 的 K_m 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[10] 较为相似, 对 UDP-葡萄糖的亲合力高于大部分细菌来源的 UGE; k_{cat} 为 79.980 min^{-1} , 其对底物的催化效率较高, 优于大部分细菌来源的 UGE。灵芝 UGE 对 D-半乳糖、葡萄糖醛酸、N-乙酰半乳糖胺、D-阿拉伯糖、D-木糖无催化能力, 对 D-葡萄糖、半乳糖醛酸、N-乙酰葡萄糖胺有催化能力。其中以 N-乙酰葡萄糖胺为底物, 反应 10 min 的转化率为 1.9%。然而大肠杆菌^[13]来源的 UGE 对 D-葡萄糖、D-半乳糖、D-果糖、D-塔格糖、D-山梨糖、D-阿洛酮糖等底物均有催化活性, 较灵芝 UGE 表现出更强的底物广谱性; 其他细菌如热荚硫细菌 (*Marinitoga piezophila*)^[19] 对于游离的单糖均无催化活性。

目前国内外对 UGE 的研究主要集中在底物特异性、过表达对生长的影响及分子改造上, 有关 UDP-葡萄糖催化生成 UDP-半乳糖转化率的研究较少。文献报道的大肠杆菌来源的 UDP-葡萄糖生成 UDP-半乳糖的转化率约为 22.0%^[23,32], 本文发现金属离子 Fe^{2+} 对纯化的 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶有激活作用, 通过 pH、温度、金属离子添加、底物/酶的配比优化反应体系, 即最佳反应条件为 pH 8.0、温度 30 °C、添加 0.05 mmol/L Fe^{2+} 且底物/酶为 1.8 时, 将转化率从初始的 16.0% 提升至 39.4%。本研究了解了灵芝 UGE 的酶学信息及灵芝多糖合成途径, 为进一步明确

UGE 在灵芝多糖发酵过程对单糖组成比例的调控机制提供了理论依据。后续研究中, 通过构建灵芝 UGE 敲除和过表达重组菌株, 分析其液态发酵过程中多糖产量、单糖组成等性质的变化, 可深入探究 UGE 对单糖组成比例的调控规律和影响机制。

REFERENCES

- [1] 崔宝凯, 吴声华. 普遍栽培灵芝种类的拉丁学名[J]. 菌物学报, 2020, 39(1): 7-12
Cui BK, Wu SH. The scientific name of the widely cultivated *Ganoderma* species[J]. Mycosystema, 2020, 39(1): 7-12 (in Chinese)
- [2] 刘高强. “瑞草”灵芝之现代研究[J]. 菌物学报, 2020, 39(1): 1-6
Liu GQ. The modern research on *Ganoderma lingzhi* (China “Ruicao”)[J]. Mycosystema, 2020, 39(1): 1-6 (in Chinese)
- [3] 徐勇亮, 徐军伟. 灵芝不同菌株胞外多糖的单糖组成和抗氧化活性分析[J]. 菌物学报, 2022: 1-10
Xu YL, Xu JW. Comparative study on monosaccharide compositions and antioxidant activities of purified exopolysaccharides from two different *Ganoderma lingzhi* strains[J]. Mycosystema, 2022: 1-10 (in Chinese)
- [4] Broussard A, Florwick A, Desbiens C, Nischan N, Robertson C, Guan ZQ, Kohler JJ, Wells L, Boyce M. Human UDP-galactose 4'-epimerase (GALE) is required for cell-surface glycome structure and function[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(5): 1225-1239
- [5] Florwick AT, Broussard A, Desbiens C, Nischan N, Robertson C, Guan ZQ, Kohler J, Wells L, Boyce M. The mammalian UDP-galactose 4'-epimerase (GalE) is required for cell surface glycome structure and function[J]. The FASEB Journal, 2019, 33(S1): 798
- [6] Liu ST, Tang YJ, Ruan N, Dang ZJ, Huang YW, Miao W, Xu ZJ, Li FC. The rice BZ1 locus is required for glycosylation of arabinogalactan proteins and galactolipid and plays a role in both mechanical strength and leaf color[J]. Rice: New York, N Y, 2020, 13(1): 41
- [7] Shvarev D, Nishi CN, Maldener I. Glycolipid composition of the heterocyst envelope of *Anabaena* sp. PCC 7120 is crucial for diazotrophic growth and relies on

- the UDP-galactose 4-epimerase HgdA[J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(8): e00811
- [8] Dong SL, Chesnokova ON, Turnbough CL Jr, Pritchard DG. Identification of the UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase involved in exosporium protein glycosylation in *Bacillus anthracis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(22): 7094-7101
- [9] Li CL, Wang YQ, Liu LC, Hu YC, Zhang FX, Mergen S, Wang GD, Schläppi MR, Chu CC. A rice plastidial nucleotide sugar epimerase is involved in galactolipid biosynthesis and improves photosynthetic efficiency[J]. *PLoS Genetics*, 2011, 7(7): e1002196
- [10] Barber C, Rösti J, Rawat A, Findlay K, Roberts K, Seifert GJ. Distinct properties of the five UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase isoforms of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(25): 17276-17285
- [11] Yang Y, Wang YY, Liu MZ, Sun ZY, Wang W. cDNA isolation and functional characterization of UDP-glucose 4-epimerase from *Davallia divaricate*[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2020, 22(3): 271-278
- [12] Kotake T, Takata R, Verma R, Takaba M, Yamaguchi D, Orita T, Kaneko S, Matsuoka K, Koyama T, Reiter WD, et al. Bifunctional cytosolic UDP-glucose 4-epimerases catalyse the interconversion between UDP-D-xylose and UDP-L-arabinose in plants[J]. *The Biochemical Journal*, 2009, 424(2): 169-177
- [13] Kim HJ, Kang SY, Park JJ, Kim P. Novel activity of UDP-galactose-4-epimerase for free monosaccharide and activity improvement by active site-saturation mutagenesis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 163(3): 444-451
- [14] Dey PM. UDP-galactose 4'-epimerase from vicia faba seeds[J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(4): 729-732
- [15] Song HB, He M, Cai ZP, Huang K, Flitsch SL, Liu L, Voglmeir J. UDP-glucose 4-epimerase and β -1,4-galactosyltransferase from the oyster *Magallana gigas* as valuable biocatalysts for the production of galactosylated products[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(6): 1600
- [16] Roper JR, Ferguson MAJ. Cloning and characterisation of the UDP-glucose 4'-epimerase of *Trypanosoma cruzi*[J]. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003, 132(1): 47-53
- [17] Banerjee N, Bhattacharyya D. UDP-glucose dehydrogenase from *Capra hircus* liver: purification, partial characterization and evaluation as a coupling enzyme in UDP-galactose 4-epimerase assay[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 68(1): 37-43
- [18] Prodan-Zitnik I, Karas-Kuzelicki N, Lukac-Bajalo J. Positive correlation between galactose-L-phosphate uridylyltransferase (GALT) and UDP-galactose-4'-epimerase (GALE) activities[J]. *Clinical Biochemistry*, 2009, 42(15): 1561-1564
- [19] 裴佩. 热荚硫细菌 UDP-葡萄糖 4-差向异构酶的基因克隆、表达及酶学性质研究[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2014
- Pei P. Cloning and characterization of the UDP-galactose 4-epimerase from *Marinitoga piezophila* KA3[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2014 (in Chinese)
- [20] Bernatchez S, Szymanski CM, Ishiyama N, Li JJ, Jarrell HC, Lau PC, Berghuis AM, Young NM, Wakarchuk WW. A single bifunctional UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase supports the synthesis of three cell surface glycoconjugates in *Campylobacter jejuni*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(6): 4792-4802
- [21] Guo HJ, Li L, Wang PG. Biochemical characterization of UDP-GlcNAc/Glc 4-epimerase from *Escherichia coli* O86:B7[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(46): 13760-13768
- [22] Kim HJ, Kang SY, Choi JH, Kim P. Activity improvement of UDP-galactose-4-epimerase for tagatose substrates by 3D structure-based combinatorial mutagenesis[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 84: 35-39
- [23] Chen X, Kowal P, Hamad S, Fan H, Wang P. Cloning, expression and characterization of a UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Letters*, 1999, 21: 1131-1135
- [24] Sakuraba H, Kawai T, Yoneda K, Ohshima T. Crystal structure of UDP-galactose 4-epimerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 512(2): 126-134
- [25] Niou YK, Wu WL, Lin LC, Yu MS, Shu HY, Yang HH, Lin GH. Role of galE on biofilm formation by *Thermus* spp.[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 390(2): 313-318
- [26] Chung SK, Ryu SI, Lee SB. Characterization of UDP-glucose 4-epimerase from *Pyrococcus horikoshii*: regeneration of UDP to produce UDP-galactose using two-enzyme system with trehalose[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 423-429

- [27] Gopal K, Agarwal S, Dixit A. High level of soluble expression and purification of catalytically active native UDP-galactose 4-epimerase of *Aeromonas hydrophila* in *E. coli*[J]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011, 2(6): 397-403
- [28] Lee LJ, Kimura A, Tochikura T. Biochemical studies on *Bifidobacterium bifidum*. V. Purification and properties of UDP-galactose 4-epimerase from *Bifidobacterium bifidum*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42(4): 731-737
- [29] 何国庆, 丁立孝. 食品酶学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006
He GQ, Ding LX. *Food Enzymology*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006 (in Chinese)
- [30] 陶丽梅, 过莹立, 李宁, 王淳, 滕脉坤, 王玉珍. Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对葡萄糖异构酶活性的影响[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(6): 1002-1005
- Tao LM, Guo YL, Li N, Wang C, Teng MK, Wang YZ. Effects of metal ions Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} and Ca^{2+} on the activity of glucose isomerase[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1999, 15(6): 1002-1005 (in Chinese)
- [31] 张帆. Co^{2+}/Mg^{2+} 对重组 *Thermobifida fusca* 葡萄糖异构酶性质的影响及固定化细胞的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013
Zhang F. The effect of Co^{2+}/Mg^{2+} on recombinant *Thermobifida fusca* glucose isomerase and the study of immobilized cells[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)
- [32] Zhang HC, Bi JY, Chen C, Huang GL, Qi QS, Xiao M, WANG PG. Immobilization of UDP-galactose 4-epimerase from *Escherichia coli* on the yeast cell surface[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2006, 70(9): 2303-2306