



重构巴斯德毕赤酵母生产3种寡糖代谢酶及其对蜜蜂的影响

徐天羽^{1,3†}, 李震^{2†}, 颜伟玉^{1,3}, 吴小波^{1,3}, 曾志将^{1,3*}

1. 江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045

2. 宜春学院生命科学与资源环境学院, 宜春 336000

3. 蜜蜂生物学与饲养江西省重点实验室, 南昌 330045

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: bees1965@sina.com

收稿日期: 2025-06-26; 接受日期: 2025-09-01; 网络版发表日期: 2025-10-24

国家蜂产业技术体系(批准号: CARS-44-KXJ15)、国家自然科学基金(批准号: 32460137)和江西省重点实验室基金项目(批准号: 2024SSY04151)资助

摘要 油茶因自交不亲和导致授粉效率低下, 而利用蜜蜂授粉时, 其花蜜中的棉籽糖家族寡糖(raffinose family of oligosaccharides, RFOs)会引发蜜蜂中毒. 本研究旨在通过重构巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达油茶地蜂(*Andrena camellia*)的3种半乳糖代谢关键酶(半乳糖激酶, galactokinase, GALK; 半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶, galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GALT; 尿苷二磷酸-4'-变位酶, uridine diphosphate galactose-4'-epimerase, GALE), 探究其对蜜蜂寡糖解毒能力的提升效果. 通过质粒重组技术构建pPIC9K-GALK/GALT/GALE表达载体, 电转化至巴斯德毕赤酵母(GS115)中, 经诱导表达获得重组酶. 通过Western blot验证蛋白表达, 并检测酶活性. 体外实验评估酶对半乳糖的代谢效率, 同时以添加重组酶的糖水饲喂西方蜜蜂(*Apis mellifera*)工蜂, 统计其存活率及中位生存期. 成功实现GALK, GALT和GALE在巴斯德毕赤酵母中的高效表达. 体外消化实验表明, 三酶联用可使半乳糖含量显著降低($P<0.05$), 并检测到Leloir途径代谢产物(UDP-葡萄糖). 饲喂实验显示: 饲喂添加3种酶的糖水的工蜂平均寿命较对照组显著延长34.43%($P<0.05$). 巴斯德毕赤酵母表达的GALK, GALT和GALE可有效代谢油茶寡糖中的半乳糖, 显著缓解蜜蜂中毒症状. 本研究为生物工程法改良蜜蜂代谢能力提供技术支撑, 对推动油茶产业可持续发展具有重要意义.

关键词 巴斯德毕赤酵母, 质粒重组, 半乳糖代谢酶, 油茶寡糖, 蜜蜂解毒

油茶(*Camellia oleifera*)是山茶科植物中最大的属, 其果实是山茶油的来源, 共有120多个物种^[1]. 油茶属于亚热带常绿小乔木, 具有很高的营养和药用价值, 主要分布在中国、印度、日本和东南亚国家^[2,3]. 尤其是

在中国南方, 包括江西、湖南、湖北、安徽、贵州、四川、云南和广西等地区, 油茶的种植面积超过4.6万平方公里, 这主要是由于其作为优质食用油生产者的效用及其独特的脂肪酸组成所促成的种植积极性^[4,5].

引用格式: 徐天羽, 李震, 颜伟玉, 等. 重构巴斯德毕赤酵母生产3种寡糖代谢酶及其对蜜蜂的影响. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 2286–2296
Xu T Y, Li Z, Yan W Y, et al. Production of three oligosaccharide-metabolizing enzymes by reconstituted *Pichia pastoris* and its effect on honey bees (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 2286–2296, doi: 10.1360/SSV-2025-0195

2025年中央一号文件提出: 支持发展油茶木本油料。

油茶自交不亲和特性导致自身授粉效率极低, 限制油茶产业的发展^[6-8]。利用蜜蜂(东方蜜蜂*Apis cerana*和西方蜜蜂*Apis mellifera*)为油茶授粉时, 油茶花蜜、花粉中含有甘露三糖、棉籽糖和水苏糖以及3种寡糖结合的半乳糖导致蜜蜂消化障碍, 造成蜜蜂死亡和蜂群崩溃^[9]。而甘露三糖、棉籽糖和水苏糖属于棉籽糖家族系列寡糖(raffinose family of oligosaccharides, RFOs)^[10,11]。此外由于主要结合成分均为半乳糖, 这3种寡糖也被称为半乳低聚糖^[9,12]。本团队前期研究表明: 专为油茶授粉的单食性野生蜂——油茶地蜂(*Andrena camellia*)可消化油茶蜂蜜和花粉中的3种寡糖, 进一步通过基因组测序发现油茶地蜂体内含有编码半乳糖苷酶(alpha-galactosidase, α -GAL)、半乳糖激酶(galactokinase, GALK)、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(galactose-1-phosphate uridylyltransferase, GALT)和尿苷二磷酸-4'-变位酶(uridine diphosphate galactose-4'-epimerase, GALE)的基因, 这4种酶的作用是分解寡糖和代谢半乳糖^[13,14]。

为解决蜜蜂为油茶授粉后中毒难题, 项目组从寡糖消化和半乳糖代谢途径进行深入研究。当前分解寡糖的半乳糖苷酶已经商品化, 可在体外水解3种有毒寡糖^[13]。在3种寡糖分解后, 随之产生的半乳糖则需要半乳糖激酶、半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶和尿苷二磷酸-4'-变位酶分3步代谢成无毒的二磷酸尿苷葡萄糖(uridine diphosphate-glucose, UDP-glucose)进入磷酸戊糖途径^[13,15]。但是目前代谢半乳糖的GALK, GALT和GALE却尚未商品化。而现有的油茶种植面积在2025年预计会超过600万公顷, 蜜蜂为油茶授粉技术已成为亟待“破卡”难题。要破解蜜蜂为油茶授粉后中毒难题, GALK, GALT和GALE的来源和制备是决定性因素。本研究拟利用毕赤酵母表达GALK, GALT和GALE这3种酶, 并探讨3种酶对蜜蜂生存状况的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试剂和耗材: pPIC9K-GALK-质粒(Zoonbio, 中国), GS115 (Thermo Fisher Scientific, 美国), DNA Marker (Zoonbio), PVDF膜(Millipore, 美国), X光片(柯达, 美国), Tryptone, Yeast Extract (OXOID, 英国), PCR反

应管(Thermo Fisher Scientific), 0.22 μ m无菌滤器和透析袋(Millipore), Agarose (上海基因公司, 中国), DNA胶纯化试剂盒、质粒小提试剂盒(AXYGEN, 美国), 常规生化试剂为国产分析纯。

Luria-Bertani培养基: 1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、1%氯化钠、1.5%琼脂粉(固体用)、NaOH调pH至7.4; YPD (yeast extract peptone dextrose medium)培养基: 2%胰蛋白胨、1%酵母提取物、2%葡萄糖(过滤除菌)、2%琼脂粉(固体用); MD培养基(minimal dextrose medium): 1.34%YNB(酵母氮源基础(yeast nitrogen base, YNB))、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、2%葡萄糖; MM培养基(mineral medium): 1.34%YNB、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、0.5%甲醇; BMMY培养基(buffered methanol-complex medium): 2%胰蛋白胨、1%酵母提取物、100 mmol/L 磷酸钾pH6.0, 1.34%YNB、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、0.5%甲醇; BMGY培养基(buffered glycerol-complex medium): 2%胰蛋白胨、1%酵母提取物、100 mmol/L磷酸钾pH6.0, 1.34%YNB、 $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素、1%甘油。

1.2 仪器

Allegra 21R台式高速冷冻离心机(Beckman, 美国); 台式高速离心机(Sorval, 德国); Mini Protean II垂直平板电泳系统、Gel Doc2000成像系统、水平电泳系统(Bio-rad, 美国); 320-S pH计(Mettler Toledo, 美国); 雪花状制冰机(Sanyo, 日本); JY92-2D超声波细胞粉碎机(新芝科器研究所, 中国); 蛋白核酸检测仪(南京大学普阳科学仪器厂, 中国); Gene Pulser Xcell 电穿孔系统(Bio-rad); 超净工作台(苏净集团, 中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 GS115-P9ICK-GALK, GALT和GALE的构建

提取质粒20 μ g, 使用*SacI*线性化, 酶切体系为10 $\times$ Buffer O 40 μ L, *SacI* 20 μ L, 质粒20 μ g, 灭菌水320 μ L, 37 $^{\circ}$ C消化3 h。取5 μ L, 进行1%琼脂糖凝胶电泳。冰浴电转杯, 将10 μ L线性化质粒加入到装有80 μ L酵母感受态细胞的1.5 mL EP管内, 混匀转移至直径为0.2 cm电转化杯中, 然后把电转杯冰浴5 min。电击条件为: 电压2 kV, 电容25 μ F, 电阻200 Ω , 电击时间为4-10 ms。电击完成后, 将600 μ L冰上预冷的浓度为1 mol/L山梨醇溶液加入到电击转化杯里, 用枪头轻轻地吹打溶液

均匀。把电转杯中的全部液体转移到新的2 mL EP管中, 30℃静置培养2 h。低速离心收集菌体, 涂布于MD平板上, 30℃恒温培养2~3天。

用灭菌牙签挑取单克隆, 在MM及MD平板上以一定的方式划线或点His⁺转化子, 确保先在MM平板上点。每个克隆换一次牙签, 点不少于50个转化子后, 30℃孵育2天。两天后, 计数平板, 如图1所示, 寻找在MD平板正常生长而在MM平板上生长很小或不长的菌株。

1.3.2 PCR鉴定阳性克隆菌株

设计的引物序列如表1所示, 由上海生工生物工程有限公司合成。以合成的GALK, GALT和GALE的基因为模板进行PCR验证。PCR条件如下: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s; 56℃ 30 s; 72℃ 90 s; 35个循环; 72℃, 7 min。反应体系包括alpha-Factor-F引物和3'AOX1 引物各5 μL, 基因组DNA 5 μL, 100 mmol/L dNTPs mixture 1 μL, 10×PCR buffer 5 μL, Taq多聚酶(5 U/μL)0.25 μL, 补水至50 μL。取等量的cDNA作为模板进行PCR链式反应, 扩增目的片段, 核酸胶电泳检测目的条带。

1.3.3 蛋白表达纯化与检测

诱导表达: 挑取单克隆, 接种至25 mL BMGY的锥形瓶中, 30℃, 250 r/min过夜培养, 摇至 $A_{600}=2\sim6$ (对数生长, 大约16~18 h); 室温2655×g离心5 min, 收集细胞, 去除上清, 用BMMY重悬细胞至 $A_{600}=1.0$, 进行诱导表达; 每24 h从培养基中取样1 mL, 并加甲醇至终浓度0.5%继续诱导; 以下各时间点0, 24, 48, 72, 96 h样品

10621×g离心2 min收集培养基上清和沉淀。对培养基上清、裂解上清、裂解沉淀的72, 96 h样品加入上样缓冲液混合重悬后进行检测。

蛋白质免疫印迹: 取上清样品上样20 μL。上样完毕后, 聚丙烯酰胺凝胶初始电压设为90 V, 先跑30~40 min, 待样品跑至浓缩凝胶和分离凝胶之间界面后, 再将电压升至200 V直到电泳结束。电泳结束后, 取下凝胶进行转膜, 恒定电压100 V转膜, 约为1.5 h, 恒流250 mA。电转结束后, 取下膜后先用PBST洗涤4次, 每次5 min。将PVDF膜置于5%脱脂奶粉封闭液中, 37℃封闭1 h。用封闭液稀释一抗, 膜在一抗稀释液中4℃过夜。次日将膜取出后用PBST洗膜4次, 每次5 min。用含5%脱脂奶粉的封闭液稀释二抗, 膜在二抗中37℃反应1 h。反应完毕后, 把膜取出后置于干净的盒子中洗膜4次, 每次5 min。随后ECL显影, 适度曝光, 并保存原始图片。本研究所使用的一抗为His, 稀释比例为1:4000, 二抗为羊抗鼠, 稀释比例为1:10000。

1.3.4 液相检测半乳糖含量

参照油茶花蜜中半乳糖含量(95.69 mg/g), 用双蒸水配置120 mL浓度为95.69 mg/g半乳糖溶液。用试管分装以上配制好半乳糖溶液, 每个试管分装2 mL半乳糖溶液, 随机分为3组, 每组3个试管。分别加入GALK, GALT, GALE。GALK, GALT和GALE添加量分别为0.52%, 0.46%和0.14%。加入3种酶消化48 h后, 检测试管中半乳糖含量。标准溶液配置: 准确称取0.2000 g D-半乳糖于10 mL容量瓶中, 加水溶解稀释至刻度, 摇匀,

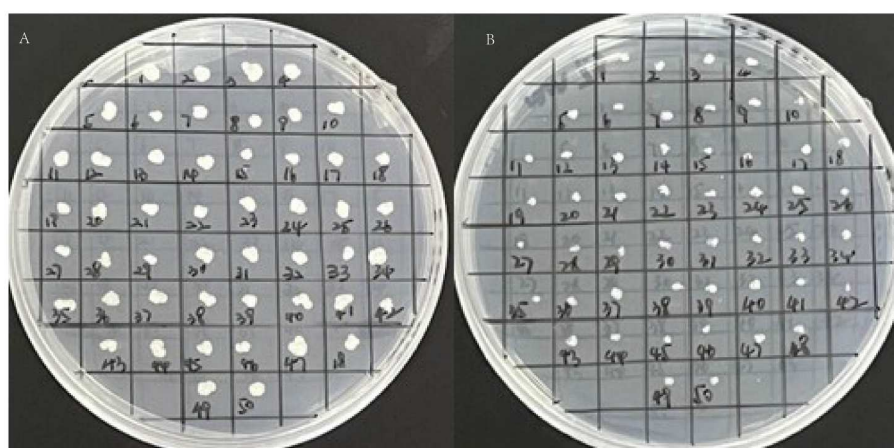


图1 转化平板。A: MD平板; B: MM平板
Figure 1 Transformation plate. A: MD plate; B: MM plate

表 1 3个基因的引物序列
Table 1 Primer sequences for three genes

引物	序列
GALK-alpha-Factor-F	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
GALK-3' AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
GALT-alpha-Factor-F	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
GALT-3'AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'
GALE-alpha-Factor-F	5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
GALE-3' AOX1	5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

制成20 mg/mL半乳糖储备液。标准曲线：分别吸取半乳糖标准液0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mL于5 mL容量瓶中，用水稀释定容。样品：取250 μ L样品于5 mL容量瓶中(稀释20倍)加73%乙腈稀释至刻度，摇匀，经0.22 μ m微孔滤膜滤过，取滤液即得供试品溶液。采用Agilent 1260型高效液相色谱仪的RID检测器来建立半乳糖的标准曲线以及各管消化液中的半乳糖浓度，Agilent Zorbox NH₂色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)，以73%乙腈-水溶液为流动相进行洗脱，流速1.0 mL/min，柱温30℃，进样体积5 μ L。洗脱梯度：等度洗脱。

1.3.5 3个半乳糖代谢酶对饲喂半乳糖的成年工蜂与采集工蜂的解毒效应

参照油茶花蜜中半乳糖含量(95.69 mg/g)，用300 mL蔗糖配制1:1糖水，分装成3个试管，每个试管100 mL，其中1个试管中加入GALK和GALT (处理1组，简称treat 1)，一个试管加入GALK, GALT, GALE (处理2组，简称treat 2)，贮存在冰箱中，供饲养工蜂使用。各组工蜂日粮如表2所示。选取新出房的西方蜜蜂工蜂600只，随机分为3组(对照组，treat 1, treat 2)，两组各200只。将200只工蜂均分后装入5个带气孔杯笼中，每杯40只。试验组工蜂每天饲喂充足已添加酶的1:1糖水；对照组工蜂每天则饲喂充足1:1糖水。这些装有工蜂的杯笼被置于培养箱中(温度：34.5℃，相对湿度：65%)培养。每天定时统计各组死蜂数量并弃去死蜂，直到所有蜜蜂死亡。利用SPSS 26.0统计3组工蜂中位生存期。利

表 2 各组食物配比(g/100 g diets)
Table 2 Diet ratios of each group (g/100g diets)

分组	半乳糖	半乳糖激酶	半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶	尿苷二磷酸-4'-变位酶	50%蔗糖溶液
Control	9.569	0	0	0	90.431
treat 1	9.569	0.520	0.460	0	89.451
treat 2	9.569	0.520	0.460	0.280	89.171

用SPSS 26.0中log-rank test检验两组工蜂的寿命是否存在显著差异，认定 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 重组质粒酶切鉴定及阳性克隆测序

酶切提取的重组质粒，酶切产物以含溴化乙锭(EB)的1%琼脂糖凝胶电泳分离UVP凝胶系统成像，电泳结果(图2A~C)显示GALK (1424 bp), GALT (1235 bp)和GALE (1028 bp)在相应的位置切出一条目的条带，说明筛有阳性克隆，将阳性质粒送到上海生工基因公司测序。菌落PCR扩增结果(图3A~C)与目的基因条带一致，且阳性克隆测序结果确认目的基因与预期序列一致(网络版附录1)，表明pPIC9K-GS115载体已成功构建。

2.2 目的蛋白的表达情况

SDS-PAGE蛋白电泳结果显示，如图4A所示，半乳糖激酶GALK在5#、6#号菌培养72及96 h的裂解沉淀检测到目的蛋白，其大小与理论值(53.0 kD)吻合。GALT在6#号菌裂解沉淀检测到目的蛋白47.3 kD (图4B)。GALE在2#，3#，4#号菌裂解沉淀检测到目的蛋白(图4C)，大小与预测(38.0 kD)相符。

2.3 3种半乳糖代谢酶对半乳糖的酶解效果

半乳糖是一种常见的单糖，Leloir通路在所有生物体中都高度保守。在通路的第一步中，半乳糖被半乳糖激酶GALK磷酸化，产物半乳糖-1-磷酸(Gal-P)经半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶GALT转化为UDP-半乳糖，同时释放葡萄糖-1-磷酸，其可进入糖酵解分解代谢。UDP-半乳糖-4-差向异构酶GALE催化UDP-Gal和UDP-葡萄糖可逆转化再生UDP-葡萄糖。在许多细菌物种中，糖核苷酸，如UDP-葡萄糖和UDP-半乳糖，对于胞外多糖的生物合成是必不可少的。使用3种半乳糖代谢相关酶在体外消化半乳糖，研究结果发现添加3种酶的处理组

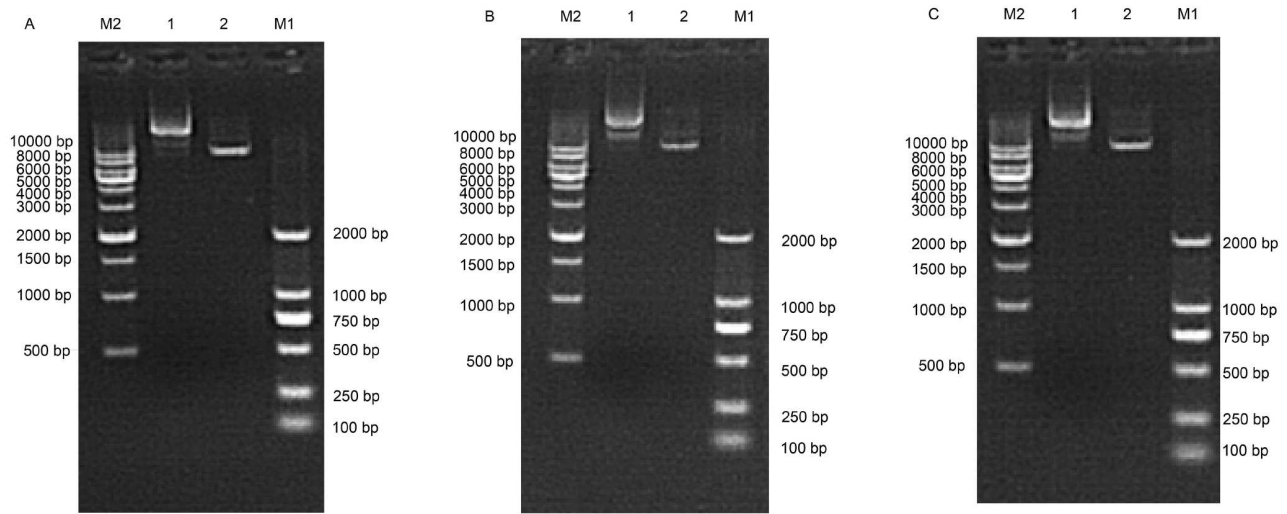


图 2 质粒酶切后产物胶图. A: GALK; B: GALT; C: GALE. 泳道M1: DL2000 DNA marker; 泳道1: 酶切前; 泳道2: 酶切后; 泳道M2: 1 kb DNA marker

Figure 2 Gel map of the product after plasmid digestion of GALK (A), GALT (B) and GALE (C). Lane M1: DL2000 DNA marker; lane 1: pre-digestion product; lane 2: plasmid digested product; lane M2: 1 kb DNA marker

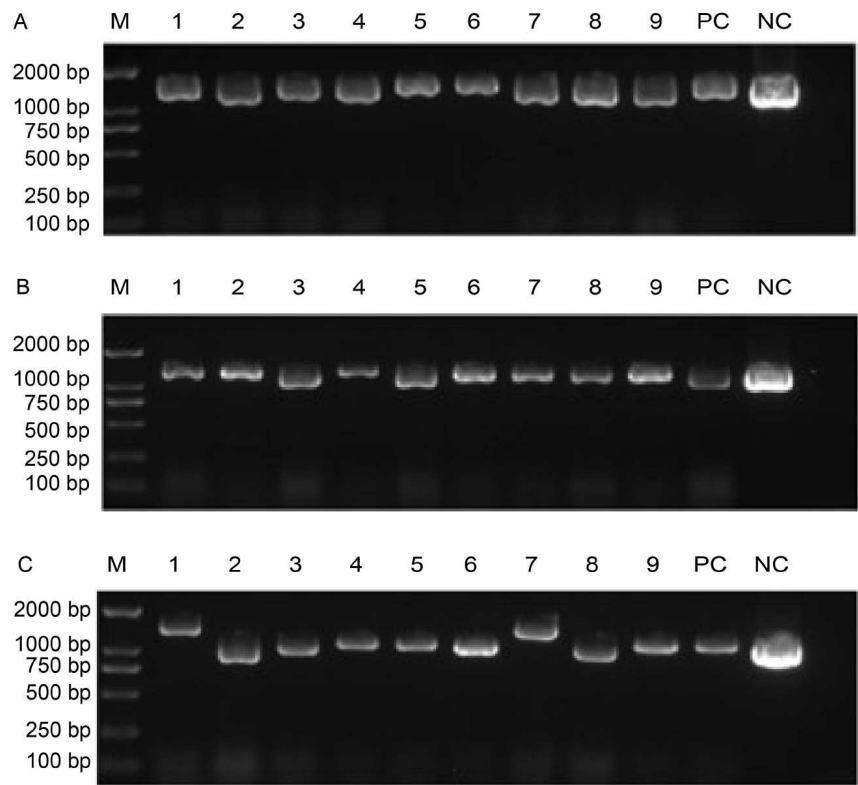


图 3 阳性克隆的PCR. A: GALK; B: GALT; C: GALE. M: DNA标准品从下到上分别为100, 250, 500, 750, 1000, 2000 bp; 1~10: 阳性菌株; PC: 阳性对照(质粒); NC: 阴性对照

Figure 3 PCR analysis of positive clones of GALK (A), GALT (B) and GALE (C). M: DNA standards from bottom to top 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 bp; 1~10: positive strains; PC: positive control (plasmid); NC: negative control

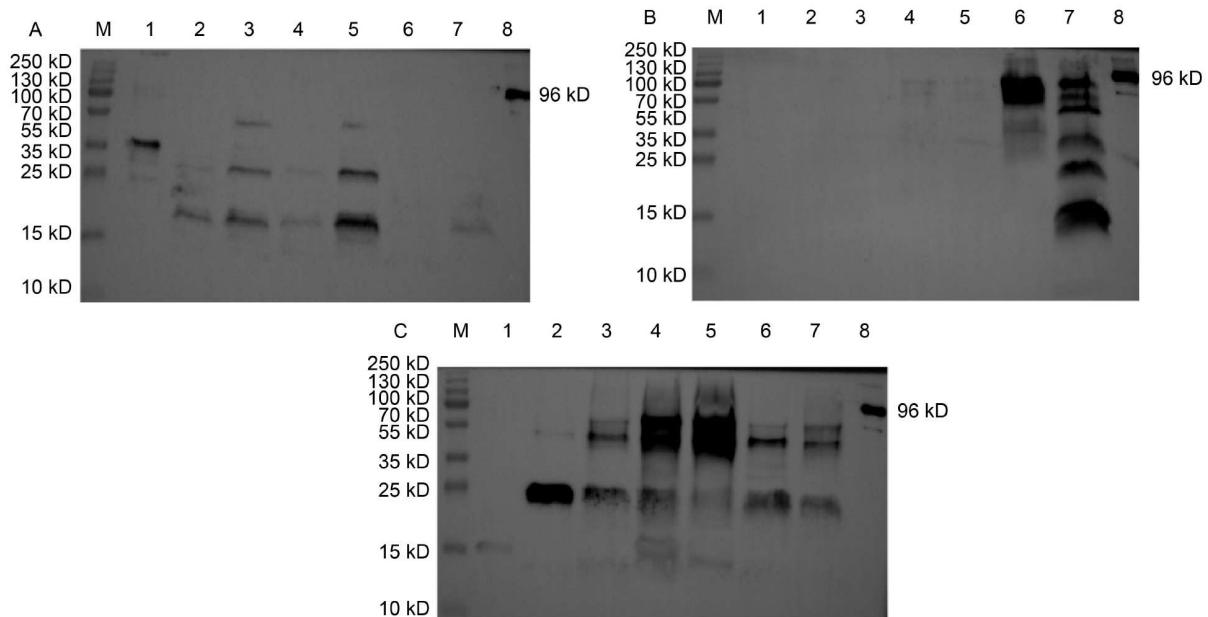


图 4 蛋白质纯化检测凝胶图。A: GALK; B: GALT; C: GALE。GALK-M (A): 蛋白标准品; 1: GS115菌株培养72 h裂解沉淀; 2: 5#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 3: 5#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 4: 6#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 5: 6#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 6: 7#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 7: 7#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 8: 阳性蛋白(m.w.=96 kD); GALT-M (B): 蛋白标准品; 1: GS115菌株培养72 h的分泌上清; 2: 6#阳性菌株培养72 h的分泌上清; 3: 6#阳性菌株培养96 h的分泌上清; 4: 6#阳性菌株培养72 h的裂解上清; 5: 6#阳性菌株培养96 h的裂解上清; 6: 6#阳性菌株培养72 h的裂解沉淀; 7: 6#阳性菌株培养96 h的裂解沉淀; 8: 阳性蛋白(HA标签m.w.=96 kD); GALE-M (C): 蛋白标准品; 1: GS115菌株培养72 h裂解沉淀; 2: 2#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 3: 2#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 4: 3#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 5: 3#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 6: 4#阳性菌株培养72 h裂解沉淀; 7: 4#阳性菌株培养96 h裂解沉淀; 8: 阳性蛋白(HA标签m.w.=96 kD)

Figure 4 Protein purification assay gel plots of GALK (A), GALT (B) and GALE (C). GALK-M (A): Protein standard; 1: GS115 strain was incubated for 72 h to lyse the pellet; 2: 5# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 3: 5# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 4: 6# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 5: 6# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 6: 7# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 7: 7# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 8: positive protein (m.w.=96 kD); GALT-M (B): protein standard; 1: secreted supernatant of GS115 strain culture for 72 h; 2: 6# positive strain culture for 72 h of secretory supernatant; 3: 6# secretory supernatant of positive strain culture for 96 h; 4: 6# lysed supernatant of positive strain culture for 72 h; 5: 6# lysed supernatant of positive strain culture for 96 h; 6: 6# lysed pellet for 72 h of incubation of positive strains; 7: 6# lysed pellet for 96 h of incubation of positive strains; 8: positive protein (HA tag m.w.=96 kD); GALE-M (C): protein standard; 1: GS115 strain was lysed and pellet after 72 h of incubation; 2: 2# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 3: 2# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 4: 3# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 5: 3# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 6: 4# positive strain culture for 72 h to lyse the pellet; 7: 4# positive strain culture for 96 h to lyse the pellet; 8: positive protein (HA tag m.w.=96 kD)

的半乳糖含量显著低于对照组(图5A~C), 这表明3种寡糖代谢酶切实有效地降低了半乳糖的含量。此外还对样品进行了质谱检测, 处理组检测出leloir途径中的除半乳糖以外的另外3种代谢糖(如半乳糖-1-磷酸、UDP-半乳糖、UDP-葡萄糖)(表3)。

2.4 复合酶对蜜蜂存活的影响

与对照组相比, treat 1组和treat 2组出房蜂和采集蜂的存活率显著提高(Chi-square=13.92, $df=1$, $P<0.01$; Chi-square=9.42, $df=1$, $P<0.01$; Chi-square=29.87, $df=1$, $P<0.01$; Chi-square= 53.68, $df=1$, $P<0.01$)(图6A和B)。如图6C和D所示: treat 2组出房蜂和采集蜂的平均生存天

数显著高于对照组出房蜂和采集蜂的平均生存天数($F_{2,59}=4.129$, $P<0.05$); 与对照组相比, treat 1组和treat 2组采集蜂的平均生存天数显著高于对照组采集蜂的平均生存天数($F_{2,351}=35.75$, $P<0.05$)。

3 讨论

油茶作为重要的木本油料作物, 其产业发展在亚洲地区呈现快速增长态势, 广泛用于食品、医药及化妆品领域^[16]。油茶的自交不亲和特性导致自然座果率低下^[17,18], 需依赖传粉昆虫完成授粉过程。油茶种植规模的扩张导致部分生态敏感区出现毁林开垦现象,

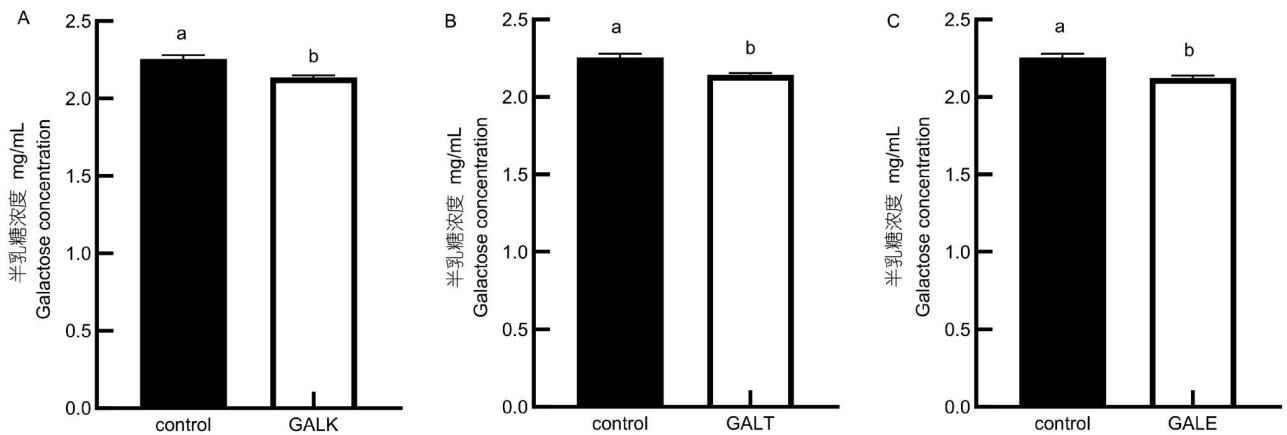


图 5 半乳糖代谢酶对半乳糖浓度的影响. A: 半乳糖激酶(GALK); B: 半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(GALT); C: 尿苷二磷酸-4'-变位酶(GALE). 相同的小写字母表示数据不存在显著差异($P>0.05$), 不同的小写字母表示数据存在显著差异($P<0.05$)
Figure 5 The effect of galactose metabolizing enzymes on lactose concentration. A: GALK; B: GALT; C: GALE. The same lowercase letter indicates data with no significant difference ($P>0.05$), and different lowercase letters indicate data with significant differences ($P<0.05$)

表 3 添加3种酶48 h后, 半乳糖及其代谢产物含量^{a)}
Table 3 Content of galactose and its metabolites after adding three enzymes for 48 h^{a)}

糖类	对照组($\mu\text{g/mL}$)	实验组
半乳糖	6367.202 $\pm$ 181.195	5420.326 $\pm$ 116.533
半乳糖-1-磷酸	ND	119.001 $\pm$ 1.372
尿苷二磷酸半乳糖	ND	123.122 $\pm$ 0.118
尿苷二磷酸葡萄糖	ND	119.396 $\pm$ 0.043

a) ND表示未检出.

单一化种植模式加剧水土流失及生物多样性衰退造成野生油茶林授粉昆虫种类和数量锐减, 导致座果率进一步下降^[19]. 油茶有传粉昆虫130余种, 其中优势授粉昆虫为油茶地蜂和大分舌蜂^[20,21]. 目前常用的手段有通过人工授粉、地熊蜂授粉和液体辅助授粉技术等提高油茶结实^[22-25]. 值得注意的是, 当蜜蜂为油茶授粉时, 会出现蜜蜂幼虫和蛹腐烂以及工蜂腹胀等中毒症状^[26,27], 造成蜂群崩溃的连锁生态风险. 研究表明, 油茶花粉中高浓度的棉籽糖家族寡糖以及寡糖分解产物(半乳糖)是导致蜜蜂中毒的关键因素^[9]. 东方蜜蜂和西方蜜蜂体内代谢寡糖和半乳糖的 α -GAL, GALK, GALT和GALE 4种酶基因表达水平和酶活性都显著低于油茶地蜂^[13]. 在大多数生物体中, 半乳糖通过Leloir途径代谢, 该途径从细菌到哺乳动物都是保守的^[28]. 半乳糖的利用需要代谢酶的密切相互作用, 因为单个成分的失调或功能障碍会导致有毒中间化合物的积累^[29]. 棉籽糖家族寡糖(甘露三糖、棉籽糖和水苏

糖), 因蜜蜂缺乏 α -半乳糖苷酶等寡糖代谢酶, 无法通过Leloir途径完成代谢转化. 该途径依赖GALK, GALT和GALE的级联反应, 将半乳糖整合至糖酵解网络^[30-32]. 当GALT活性受抑制时, 半乳糖-1-磷酸的异常积累可抑制磷酸葡萄糖变位酶, 导致糖代谢通量阻滞及ATP合成障碍, 引起经典半乳糖血症^[33]. 针对此代谢毒性, 重构寡糖酶代谢通路成为关键策略: 通过合成生物学重构毕赤酵母表达3种寡糖代谢关键酶——GALK (EC 2.7.1.6), GALT (EC 2.7.7.12)以及GALE (EC 5.1.3.2), 以系统性降解寡糖并缓解蜜蜂代谢压力.

毕赤酵母作为真核表达系统的代表, 广泛应用于异源蛋白的表达^[34]. 其核心优势体现在高效的表达能力和翻译后修饰特性: 通过AOX1启动子的甲醇诱导或GAP启动子的组成型表达, 可实现g/L级别的蛋白产量, 远超酿酒酵母等传统系统^[35]; 同时, 其糖基化修饰模式(如N-连接糖基化)更接近哺乳动物, 避免了酿酒酵母中 α -1,3糖苷键引发的免疫原问题^[36]. 目前已有多种天然化合物在毕赤酵母中表达和生产, 如萜类、聚酮类和黄酮类等^[37]. 此外, 毕赤酵母在廉价培养基中高密度发酵的可行性及分泌型表达的天然优势, 使重组蛋白较易纯化, 大幅降低了工业化生产成本^[36].

此前本团队通过克隆油茶地蜂 α -GAL, GALK, GALT和GALE 4种酶基因并成功在大肠杆菌体内表达, 但是由于大肠杆菌存在内毒素以及饲喂给蜜蜂

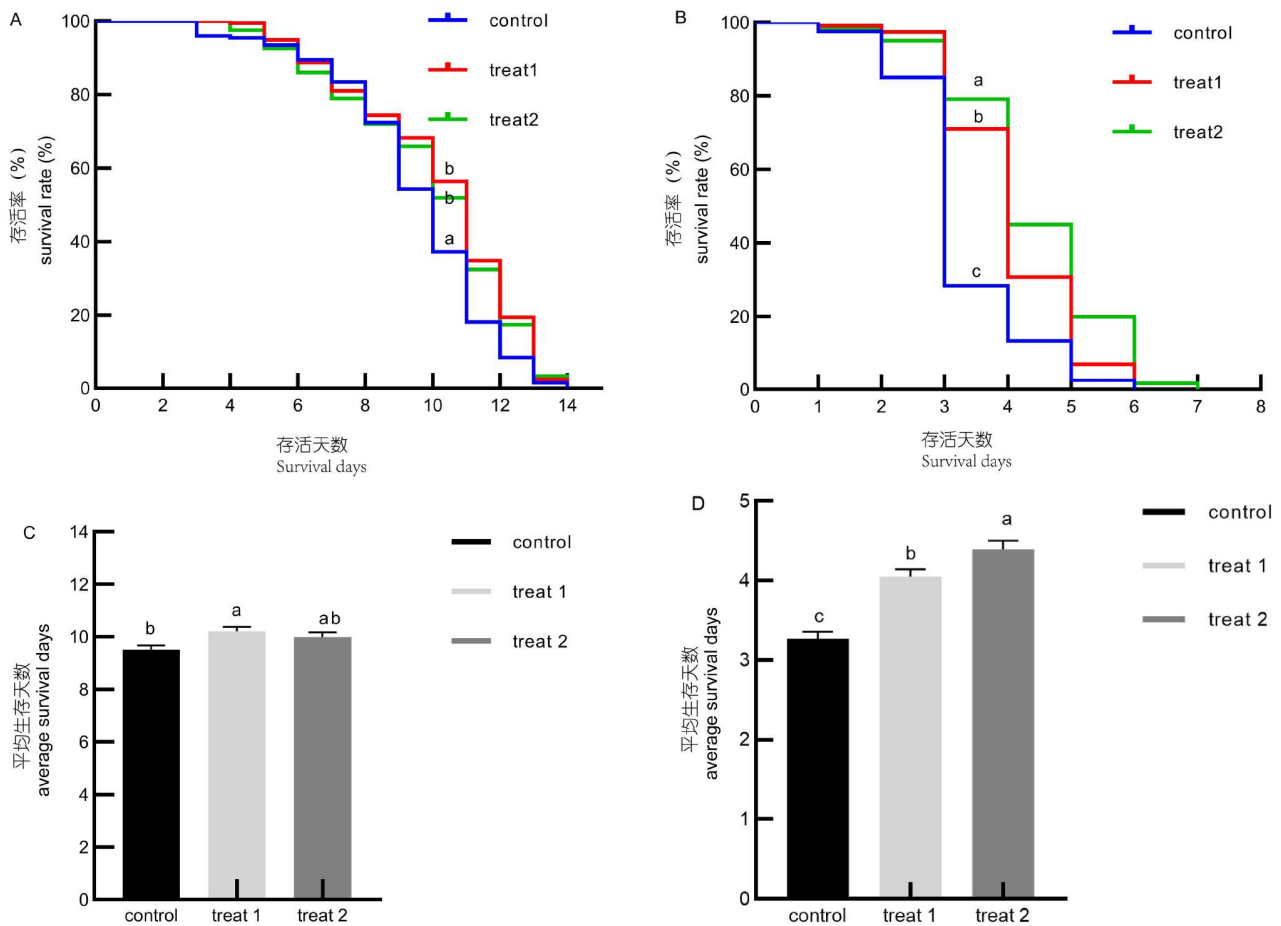


图 6 复合酶对蜜蜂存活的影响。A: 半乳糖激酶(GALK), 半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(GALT)和尿苷二磷酸-4'变位酶(GALE)对饲喂半乳糖的出房蜂的存活率的影响; B: 半乳糖激酶(GALK), 半乳糖-1-磷酸尿苷转移酶(GALT)和尿苷二磷酸-4'变位酶(GALE)对饲喂半乳糖的采集蜂的存活率的影响; C: 出房蜂平均寿命图; D: 采集蜂平均寿命图。在SPSS Statistics26.0中使用单因素方差分析方法分析酶1组, 酶2组与对照组蜜蜂平均寿命差异; 相同的小写字母表示数据不存在显著差异($P>0.05$), 不同的小写字母表示数据存在显著差异($P<0.05$)

Figure 6 The impact of composite enzymes on the survival of bees. A: Effects of galactokinase (GALK), galactose-1-phosphouridinetransferase (GALT) and uridine diphosphate-4' mutase (GALE) on the survival rate of galactose-fed workers; B: effects of galactose kinase (GALK), galactose-1-phosphouridinetransferase (GALT) and uridine diphosphate-4' mutase (GALE) on the survival rate of galactose-fed foragers; C: the average lifetime of emergence worker bees; D: the average lifetime of foragers. The same lowercase letter indicates data no significant difference ($P>0.05$), and different lowercase letters indicate data significant differences ($P<0.05$)

后可能产生污染蜂产品的风险。本研究选择重构巴斯德毕赤酵母生产油茶地蜂GALK, GALT和GALE 3种寡糖代谢酶, 研究结果发现饲喂这3种寡糖代谢酶可以提高蜜蜂对半乳糖的耐受性, 提高蜜蜂生存率。油茶地蜂作为油茶的优势授粉昆虫, 其对油茶蜜粉中寡糖的代谢能力显著强于东方蜜蜂和西方蜜蜂。通过生物工程手段, 提高西方蜜蜂体内GALK, GALT和GALE 3种酶的活性, 使其能够高效代谢油茶蜜粉中的寡糖, 是解决蜜蜂访问油茶花后中毒问题的关键。

本研究使用3种半乳糖代谢相关酶在体外消化半乳糖, 研究结果发现添加3种酶的处理组的半乳糖显著低于对照组, 这表明3种寡糖代谢酶切实有效地降低了半乳糖的含量。此外, 本研究还对样品进行了质谱检测, 处理组检测出Leloir途径中的除半乳糖以外的另外3种代谢糖(半乳糖-1-磷酸、UDP-半乳糖和UDP-葡萄糖)。而用3种寡糖代谢酶饲喂以半乳糖为日粮的出房蜂和采集蜂时, 显著提高出房工蜂和采集工蜂的平均生存天数。

本研究在*S. stipitis* (GS115)菌株中构建GALK, GALT和GALE的从头合成途径, 下一步本团队将致力于优化酶的表达效率和活性, 以期实现规模化生产, 为利用蜜蜂给油茶花授粉提供技术支撑。

参考文献

- 1 Yang C, Liu X, Chen Z, et al. Comparison of oil content and fatty acid profile of ten new *Camellia oleifera* cultivars. *J Lipids*, 2016, 2016: 1–6
- 2 Yang P, Li X, Liu Y L, et al. Two triterpenoid glycosides from the roots of *Camellia oleifera* and their cytotoxic activity. *J Asian Nat Prod Res*, 2015, 17: 800–807
- 3 Wang S, Chen Z, Tong X, et al. Triterpenoids from the roots of *Camellia oleifera* C.A^{bel} and their cytotoxic activities. *Helvetica Chim Acta*, 2013, 96: 1126–1133
- 4 Hu J, Shi Y, Liu Y, et al. Anatomical structure of *Camellia oleifera* shell. *Protoplasma*, 2018, 255: 1777–1784
- 5 Tai Y, Ling C, Wang H, et al. Comparative Transcriptomic analysis reveals regulatory mechanisms of theanine synthesis in tea (*Camellia sinensis*) and Oil Tea (*Camellia oleifera*) plants. *J Agric Food Chem*, 2019, 67: 10235–10244
- 6 Zhou Q, Zheng Y, Sun M. Comparative *de novo* transcriptome analysis of fertilized ovules in *Xanthoceras sorbifolium* uncovered a pool of genes expressed specifically or preferentially in the selfed ovule that are potentially involved in late-acting self-incompatibility. *PLoS One*, 2015, 10: e0140507
- 7 Gao C, Yuan D, Yang Y, et al. Pollen tube growth and double fertilization in *Camellia oleifera*. *J Amer Soc Hort Sci*, 2015, 140: 12–18
- 8 Gao C, Yuan D Y, Wang B F, et al. A cytological study of anther and pollen development in *Camellia oleifera*. *Genet Mol Res*, 2015, 14: 8755–8765
- 9 Li Z, Huang Q, Zheng Y, et al. Identification of the toxic compounds in *Camellia oleifera* honey and pollen to honey bees (*Apis mellifera*). *J Agric Food Chem*, 2022, 70: 13176–13185
- 10 Li Z, Huang Q, Zheng Y, et al. Kaempferitrin: a flavonoid marker to distinguish *Camellia oleifera* honey. *Nutrients*, 2023, 15: 435
- 11 Wu J Y, Mao B Y, Gu J Y, et al. Isolation and identification of the intestinal bacteria capable of utilizing stachyose and its utilization characteristics (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2020, 46: 16–23 [郭佳颖, 毛丙永, 谷佳玉, 等. 利用水苏糖的肠道细菌的分离鉴定及其利用特性研究. *食品与发酵工业*, 2020, 46: 16–23]
- 12 Wu J Y, Chen M X, Jing T C, et al. Utilization characteristics of stachyose by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2021, 47: 13–20 [郭佳颖, 陈敏暄, 金天赐, 等. 双歧杆菌和乳杆菌对水苏糖的利用特性. *食品与发酵工业*, 2021, 47: 13–20]
- 13 Li Z, Zhong S, Huang Q, et al. The mechanism of *Andrena camellia* in digesting toxic sugars. *iScience*, 2024, 27
- 14 Li Z, Huang Q, Zhong S Q, et al. Construction of genome map and comparative genome analysis of *Andrena camellia* (Hymenoptera: Andrenidae) (in Chinese). *Acta Entomol Sin*, 2024, 11: 2–11 [李震, 黄强, 钟史清, 等. 油茶地蜂基因组图谱的构建及比较基因组分析. *昆虫学报*, 2024, 11: 2–11]
- 15 Daenzer J M I, Sanders R D, Hang D, et al. UDP-galactose 4'-epimerase activities toward UDP-Gal and UDP-GalNAc play different roles in the development of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002721
- 16 Wang Z, Zhu X M. Research on efficient cultivation and industrial development of *Camellia oleifera* (in Chinese). *Hubei For Sci Technol*, 2023, 52: 55–60+90 [王哲, 朱香明. 油茶高效种植及产业发展研究. *湖北林业科技*, 2023, 52: 55–60+90]
- 17 Liao T. Study on self-incompatibility of *Camellia oleifera* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2013 [廖婷. 油茶自交不亲和性初步研究. 硕士学位论文. 长沙: 中南林业科技大学, 2013]
- 18 Zhou J Q. Omic analysis and key genes research of self-incompatibility in *Camellia oleifera* (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2020 [周俊琴. 油茶自交不亲和性的组学解析与关键基因研究. 博士学位论文. 长沙: 中南林业科技大学, 2020]
- 19 Huang D Y, He B, Gu P, et al. Discussion on current situation and research direction of pollination insects of *Camellia oleifera* (in Chinese). *J Environ Entomol*, 2017, 39: 213–220 [黄敦元, 何波, 谷平, 等. 油茶传粉昆虫研究现状与方向的探讨. *环境昆虫学报*, 2017, 39: 213–220]
- 20 Deng Y Y. Study on pollination biology of *Camellia oleifera* (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2009 [邓园艺. 油茶的传粉生物学研究. 硕士学位论文. 长沙: 中南林业科技大学, 2009]
- 21 Wei W, Li X Y, Wei X, et al. Review of species, nesting and pollination behaviors of pollinating insects in *Camellia* spp. (in Chinese). *Guangxi*

- For Sci, 2017, 46: 98–101 [韦维, 李雪媛, 韦幸, 等. 油茶传粉昆虫种类、筑巢及访花行为的研究进展. 广西林业科学, 2017, 46: 98–101]
- 22 Liu D C, Yao G Q, Peng X D, et al. Effect of different pollination methods on fruit setting rate of *Camellia oleifera* cenruan clone forest (in Chinese). For Invent Plan, 2023, 48: 188–190 [刘德承, 姚国琼, 彭雪迪, 等. 不同授粉方式对岑溪软枝油茶家系林座果率的影响研究. 林业调查规划, 2023, 48: 188–190]
 - 23 Xu A K, Zhao K X, Wei W, et al. Study and application of liquid pollination technology of *Camellia oleifera* (in Chinese). J Chongqing Norm Univ (Nat Sci), 2023, 40: 122–128 [徐安糠, 赵凯旋, 魏玮, 等. 油茶液体辅助授粉技术研究及应用. 重庆师范大学学报(自然科学版), 2023, 40: 122–128]
 - 24 Zhong P X, Xie Z C, Wu Y X, et al. A preliminary study on the effect of bumblebees on pollination and fruiting of *Camellia oleifera* (in Chinese). Apic China, 2019, 70: 69–72 [钟培星, 谢再成, 吴延旭, 等. 熊蜂对油茶授粉结实的影响初探. 中国蜂业, 2019, 70: 69–72]
 - 25 Zhu X S, Yuan B, Yuan D Y, et al. Flower visiting behavior and pollination effect of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in *Camellia oleifera* plantation (in Chinese). Acta Entomol Sin, 2025, 68: 311–320 [朱兴赛, 袁斌, 袁德义, 等. 地熊蜂在油茶园中的访花行为与授粉效果. 昆虫学报, 2025, 68: 311–320]
 - 26 Li Z, Huang Q, Peng C T, et al. Cultivation and application of *Camellia oleifera* pollination bees (in Chinese). Acta Agric Univ Jiangxiensis, 2023, 45: 944–951 [李震, 黄强, 彭成涛, 等. 油茶授粉蜜蜂的培育与应用. 江西农业大学学报, 2023, 45: 944–951]
 - 27 Yuan Z S, Zhang Z B. Discussion on the prevention and control technology of *Camellia oleifera* nectar poisoning in *Apis cerana* (in Chinese). Hunan J Anima Sci Vet Med, 2022, 2: 21–23 [袁正赛, 张祖标. 中蜂油茶花蜜中毒的防治技术探讨. 湖南畜牧兽医, 2022, 2: 21–23]
 - 28 Frey P A. The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J*, 1996, 10: 461–470
 - 29 Schuler D, Höll C, Grün N, et al. Galactose metabolism and toxicity in *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, 2018, 114: 42–52
 - 30 Demirbas D, Coelho A I, Rubio-Gozalbo M E, et al. Hereditary galactosemia. *Metabolism*, 2018, 83: 188–196
 - 31 Holden H M, Rayment I, Thoden J B. Structure and function of enzymes of the leloir pathway for galactose metabolism. *J Biol Chem*, 2003, 278: 43885–43888
 - 32 Sunwoo I Y, Sukwong P, Park Y R, et al. Enhancement of galactose uptake from *Kappaphycus alvarezii* Hydrolysate using *saccharomyces cerevisiae* through overexpression of leloir pathway genes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, 193: 335–348
 - 33 Coelho A I, Rubio-Gozalbo M E, Vicente J B, et al. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *J Inher Metab Dis*, 2017, 40: 325–342
 - 34 Barone G D, Emmerstorfer-Augustin A, Biundo A, et al. Industrial production of proteins with *Pichia pastoris*—*Komagataella phaffii*. *Biomolecules*, 2023, 13: 441
 - 35 Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. *Biochem Eng J*, 2012, 64: 91–105
 - 36 Karbalaee M, Rezaee S A, Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol*, 2020, 235: 5867–5881
 - 37 Gao J, Jiang L, Lian J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. *Synth Syst Biotechnol*, 2021, 6: 110–119

Production of three oligosaccharide-metabolizing enzymes by reconstituted *Pichia pastoris* and its effect on honey bees

XU TianYu^{1,3†}, LI Zhen^{2†}, YAN WeiYu^{1,3}, WU XiaoBo^{1,3} & ZENG ZhiJiang^{1,3*}

¹ Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China

² College of Life Science and Resources and Environment, Yichun University, Yichun 336000, China

³ Jiangxi Province Key Laboratory of Honeybee Biology and Beekeeping, Nanchang 330045, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding author, E-mail: bees1965@sina.com

Due to self-incompatibility, *Camellia*'s pollination efficiency is low. When honey bees are introduced for pollination, the raffinose oligosaccharides in the nectar induce bee poisoning. The purpose of this study is to reconstruct *Pichia pastoris* to express three key enzymes of galactose metabolism (GALK, GALT, GALE) in *Andrena camellia* to explore their effect on the detoxification ability of oligosaccharides in honeybees. The pPIC9K-GALK/GALT/GALE expression vector was constructed using plasmid recombination technology, which was then electrotransformed into *Pichia pastoris* GS115 and induced to produce the recombinant enzyme. Protein expression was verified by Western blot. In *in vitro* experiments, we fed honey bees sugar water supplemented with the recombinant enzymes. We then evaluated the metabolic efficiency of the enzymes in galactose, the survival rate, and the median survival of the bees. The results showed that the efficient expression of GALK, GALT, and GALE in *P. pastoris* was successfully achieved. In *in vitro* digestion experiments, the combination of three enzymes could significantly reduce the content of galactose ($P<0.05$), and we detected Leloir pathway metabolites (such as UDP-glucose). The feeding experiment showed that the median survival of the worker bees supplemented with three enzymes was 34.43% longer than that of the control group ($P<0.05$). GALK, GALT, and GALE expressed by *Pichia pastoris* can effectively metabolize galactose in *Camellia oleifera* oligosaccharides, significantly alleviating the symptoms of bee poisoning. This study provides technical support for improving honey bee metabolism using the bioengineering method, which is of great significance for promoting the sustainable development of the *Camellia oleifera* industry.

***Pichia pastoris*, plasmid recombination, galactose metabolizing enzymes, oligosaccharide metabolism, honeybee detoxification**

doi: [10.1360/SSV-2025-0195](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0195)