

· 研究报告 ·

酶法催化甲醛合成木酮糖

崔博^{1,2}, 卓炳照³, 逯晓云², 王文³, 肖冬光¹, 江会锋²

1 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

3 西北工业大学, 陕西 西安 710072

崔博, 卓炳照, 逯晓云, 等. 酶法催化甲醛合成木酮糖. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1128–1136.

Cui B, Zhuo BZ, Lu XY, et al. Enzymatic synthesis of xylulose from formaldehyde. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1128–1136.

摘要: 木酮糖是生物体内的代谢中间产物, 是多种稀有糖合成的前体物质, 因其独特的生物活性在膳食、保健、医药等领域发挥着重要作用。本研究旨在从最基本有机原料之一的甲醛出发, 利用生物酶法催化甲醛合成木酮糖。通过来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的苯甲酸脱羧酶 (Benzoylformate decarboxylase) 突变体 BFD-M3 催化甲醛聚合生成羟基乙醛和 1,3-二羟基丙酮 (DHA)。通过来源于大肠杆菌的转醛醇酶 (Transaldolase) 突变体 TalB-F178Y 进一步催化羟基乙醛和 DHA 聚合生成木酮糖, 最终实现甲醛到木酮糖的酶法转化, 转化率为 0.4%。此外, 经过优化甲醛底物浓度, 木酮糖转化率达到 4.6%, 比优化前提高了 11.5 倍。为了进一步提高木酮糖的转化率, 采用 Scaffold 多酶组装技术固定 BFD-M3、TalB-F178Y 蛋白, 使木酮糖转化率达到 14.02%, 较未用 Scaffold 技术前提高 3 倍, 为生物法合成稀有糖提供了一种新方案。

关键词: 木酮糖, 甲醛, 酶法催化, Scaffold 多酶组装技术

Enzymatic synthesis of xylulose from formaldehyde

Bo Cui^{1,2}, Bingzhao Zhuo³, Xiaoyun Lu², Wen Wang³, Dongguang Xiao¹, and Huifeng Jiang²

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 Northwestern Polytechnic University, Xi'an 710072, Shaanxi, China

Abstract: Xylulose as a metabolic intermediate is the precursor of rare sugars, and its unique pattern of biological activity plays an important role in the fields of food, health, medicine and so on. The aim of this study was to design a new pathway for xylulose synthesis from formaldehyde, which is one of the most simple and basic organic substrate. The pathway was comprised of 3 steps: (1) formaldehyde was converted to glycolaldehyde by benzoylformate decarboxylase mutant BFD-M3 (from *Pseudomonas putida*); (2) formaldehyde and glycolaldehyde were converted to dihydroxyacetone by BFD-M3 as well; (3) glycolaldehyde and dihydroxyacetone were converted to xylulose by transaldolase mutant

Received: November 25, 2017; **Accepted:** January 12, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31670100), the Hundred Talents Program of the Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Huifeng Jiang. Tel/Fax: +86-22-24828732; E-mail: jiang_hf@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (No. 31670100), 中国科学院百人计划资助。

TalB-F178Y (from *Escherichia coli*). By adding formaldehyde (5 g/L), BFD-M3 and TalB-F178Y in one pot, xylulose was produced at a conversion rate of 0.4%. Through optimizing the concentration of formaldehyde, the conversion rate of xylulose was increased to 4.6% (20 g/L formaldehyde), which is 11.5 folds higher than the initial value. In order to further improve the xylulose conversion rate, we employed Scaffold Self-Assembly technique to co-immobilize BFD-M3 and TalB-F178Y. Finally, the xylulose conversion rate reached 14.02%. This study provides a new scheme for the biosynthesis of rare sugars.

Keywords: xylulose, formaldehyde, enzymatic catalysis, Scaffold Self-Assembly technique

木酮糖 (Xylulose) 是一种戊酮糖,在自然界中存在但含量极少,属于稀有糖。木酮糖存在 L、D 两种构型且在生物体内可以相互转换^[1-3],涉及到多种生物学、生理学功能。例如,木酮糖是合成多种稀有糖的前体物质^[4-6],是实现稀有糖转化的重要桥梁;在医学上,木酮糖能抑制肠道蔗糖酶和麦芽糖酶活性从而抑制餐后血糖升高,成为降血糖食品的理想活性成分^[7];木酮糖还可以与 ATP 反应生成 D-木酮糖-5-磷酸进入磷酸戊糖途径,参与细胞中心代谢途径^[8-9]。

目前木酮糖的合成主要通过化学法和生物法转化糖醇来实现。其中化学法合成木酮糖是利用山梨糖醇作为原料,通过多步催化氧化完成。由于化学法生产工艺复杂且副产物多,木酮糖得率低,因而不利于规模化生产^[10]。生物法主要通过木酮糖还原酶 (EC 1.1.1.10 或 EC 1.1.1.9) 转化木糖醇生产 L-木酮糖或 D-木酮糖^[11-13],其具有反应条件温和、生产步骤简单、产品纯度高特点,但生产成本较大。因此,以廉价的原料通过生物转化法生产木酮糖已成为生物工程重要研究方向之一。

一碳 (C1) 化合物包括无机 CO₂ 和 CO,有机甲醇、甲醛等,具有来源广泛、价格低廉等特点^[14],在工业生物技术中具有广泛的应用前景^[15-17]。其中甲醛是其他一碳化合物转化为生物利用的中间物质^[18]。华盛顿大学 David Baker 教授构建了一条以 CO₂ 为原料途经甲醛合成羟基乙醛以及 1,3-二羟基丙酮 (DHA) 的代谢通路,为以甲醛为原料合成大宗化学品提出了一个良好的开端^[19]。同

时,笔者实验室也在从事以甲醛为原料形成羟基乙醛的相关课题。自然界中不存在催化甲醛合成羟基乙醛或 DHA 的酶,实验室通过对来源于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的苯甲酸脱羧酶 (Benzoylformate decarboxylase, BFD) 进行定点饱和突变,最终筛选获得了一个可以高效聚合甲醛分子产生羟基乙醛和 DHA 化合物的突变体 BFD-W86R-N87T-L109G-L110E-A460M (BFD-M3)^[20]。此外,相关研究显示来源于大肠杆菌的转酮酶 (Transaldolase, TalB) 突变体 TalB-F178Y 能够催化非磷酸化底物 DHA 作为反应供体进行醛缩反应,如催化 DHA 与甘油醛、羟基乙醛等缩合合成果糖和木酮糖等^[21]。

本研究从甲醛出发,设计了一条酶法催化甲醛合成木酮糖的生物途径,利用 BFD-M3 和 TalB-F178Y 一锅酶法直接催化甲醛合成木酮糖,并对复合酶反应体系进行优化。以甲醛为原料合成木酮糖,为稀有糖生产技术发展提供了新思路,同时为一碳资源的利用奠定一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

本研究所用菌株及质粒见表 1。

1.1.2 实验试剂

酵母粉和胰蛋白胨购自英国 Oxoid 公司; NaCl、硫酸卡那霉素 (Kanamycin, Kan⁺)、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp^r)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、羟基乙醛、DHA 购自北京索莱

表 1 本文所用的菌株及质粒

Table 1 Plasmids and strains used in this work

Stains and Plasmids	Characteristics	Source
Stains		
DH5 α	$\delta 80lacZ\Delta M15$	TransGen
BL21 (DE3)	F-opmThsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)	TransGen
Plasmids		
pET28a - <i>talB</i> -F178Y	pET28a based vector, containing <i>TalB</i> -F178Y, Kan ⁺	Lab collection
pET28a- <i>bfd</i> -M3	pET28a based vector, containing BFD-M3, Kan ⁺	Lab collection
pET20b- <i>tim</i> -ctdoc ^[22]	pET20b based vector, containing TIM module (TTC0581) from <i>T. thermophiles</i> and the dockerin module from <i>C. thermocellum</i> , Amp ^r	Gifted by You C
pET20b- <i>ald</i> -ccsdoc ^[22]	pET20b based vector, containing ALD module (TM0273) from <i>T. maritime</i> and the dockerin module from <i>C. cellulovorans</i> , Amp ^r	Gifted by You C
pET20b- <i>cbm3</i> -scaf ^[22]	pET20b based vector, containing a CBM3 module from <i>C. thermocellum</i> CipA and three different cohesins from <i>C. thermocellum</i> , <i>C. cellulovorans</i> and <i>R. flavefaciens</i> , Amp ^r	Gifted by You C
pET28a- <i>bfd</i> -M3-ctdoc	pET28a based vector, containing BFD-M3 and the dockerin module from <i>C. cellulovorans</i> , Kan ⁺	This study
pET28a- <i>talB</i> -F178Y-ccsdoc	pET28a based vector, containing <i>TalB</i> -F178Y and the dockerin module from <i>C. thermocellum</i> , Kan ⁺	This study
pET20b- <i>cbm</i> -scaf	pET20b based vector, containing a CBM3 module from <i>C. thermocellum</i> CipA and cohesin from <i>C. thermocellum</i> , cohesin from <i>C. cellulovorans</i> , Amp ^r	This study

宝科技有限公司；纤维素 (RAC)、D-木酮糖购自上海源叶生物科技有限公司。

LB 培养基：酵母粉 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，NaCl 10 g/L，用于质粒的构建、扩增、种子液的培养。发酵培养基 (2YT)：胰蛋白胨 16 g/L，酵母粉 10 g/L，NaCl 5 g/L，用于蛋白质的过表达。

蛋白缓冲液 A：50 mmol/L K₃PO₄，5 mmol/L MgSO₄，0.5 mmol/L TPP，pH 7.4。

蛋白缓冲液 B：50 mmol/L K₃PO₄，5 mmol/L MgSO₄，0.5 mmol/L TPP，1 mol/L 咪唑，pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 酶表达纯化

pET28a-*bfd*-M3 和 pET28a-*talB*-F178Y 质粒为本实验室保存。分别将库存质粒 pET28a-*bfd*-M3 和 pET28a-*talB*-F178Y 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，挑取单克隆接种于含 5 mL LB 液体培养基

的小试管中，37 °C、220 r/min 过夜培养，作为种子液。将种子液按 1% (V/V) 接种量转入 800 mL 2YT 液体培养基中，37 °C、220 r/min 摇床培养至 OD₆₀₀ 为 0.6–0.8。加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，16 °C 诱导表达 16–18 h。5 000 r/min 离心 10 min 后弃上清，30 mL 蛋白缓冲液 A 重悬菌体。

重悬细胞液利用高压低温匀质破碎机破碎，(1 200 bar，3 次)。15 000 r/min、4 °C 离心 50 min 去除细胞碎片。取上清液采用镍亲和层析方法纯化目的蛋白，不同咪唑浓度洗脱的样品用 10% SDS-PAGE 检测。将收集到的电泳均一性较好的目的蛋白用 15 mL Amicon 超滤管 (10 kDa, Millipore 公司) 离心浓缩 (4 °C、3 600 r/min)，30 mL 蛋白缓冲液 A 换液确保除去蛋白中的咪唑，得到纯化蛋白。采用 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) 测定蛋白浓度，纯化蛋白于

-80 °C 保存备用。

在上述培养和转化过程中,视菌株所带质粒情况添加相应的抗生素。硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的工作浓度为 100 μg/mL。

1.2.2 酶催化反应

一锅酶法催化甲醛合成木酮糖。样品 (200 μL): 1 mg/mL BFD-M3, 1 mg/mL TalB-F178Y, 5 g/L 甲醛, 50 mmol/L K₃PO₄, 5 mmol/L MgSO₄, 0.5 mmol/L TPP, pH 7.4; 对照 (200 μL): 5 g/L 甲醛, 50 mmol/L K₃PO₄, 5 mmol/L MgSO₄, 0.5 mmol/L TPP, pH 7.4。上述反应于振荡反应器中 300 r/min、37 °C 反应 24 h。

1.2.3 多酶组装技术

该技术^[22]的原理是通过人工合成的支架固定催化反应中的酶,缩短酶与酶的空间距离,在底物通道效应的基础上提高了底物与酶的反应效率。Scaffold 蛋白支架上带有若干个相邻的受体结合位点,可以与带标签的不同蛋白结合。同时,蛋白支架上还有一个 CBM 蛋白,可以与 RAC 结合。与 RAC 结合后的蛋白经过高速离心,即可快速得到酶复合物, Scaffold 多酶组装原理如图 1 所示。

1.2.4 重组质粒构建

以构建 pET28a-*bfd*-M3-ctdoc 重组质粒为例。设计对应引物,分别以 pET28a-*bfd*-M3、pET20b-*tim*-ctdoc 为模板,PCR 扩增获得线性 pET28a-*bfd*-M3 和 ctdoc 片段,将 PCR 产物消化、纯化后采用 Gibson 连接方法^[23]连接,产物转入 DH5α 感受态细胞,在含有 Kan⁺的 LB 平板上过夜培养。挑选单克隆,进行菌落 PCR 验证,验证正确的克隆提取质粒测序,将测序正确的质粒置于-20 °C 冰箱保存备用。

1.2.5 复合酶组装

在 BL21 (DE3) 中分别过表达 BFD-M3-CtDoc、TalB-F178Y-CcsDoc、CBM-Scaffold 蛋白(方法 1.2.1),各取 100 mL 培养液,5 000 r/min 离心 10 min 收集细胞。分别用 10 mL 蛋白缓冲液 A 重悬细胞,细胞悬液等体积混合,利用高压低温匀质破碎仪破碎。细胞破碎液 15 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,即获得粗酶液。30 mL 粗酶液和 50 mg RAC 纤维素凝胶混合,室温静置 5 min,使其充分结合后离心弃上清,蛋白缓冲液 A 洗 2 次后重悬于 10 mL 蛋白缓冲液 A。利用 Pierce BCA Protein Assay Kit 测定复合酶浓度。

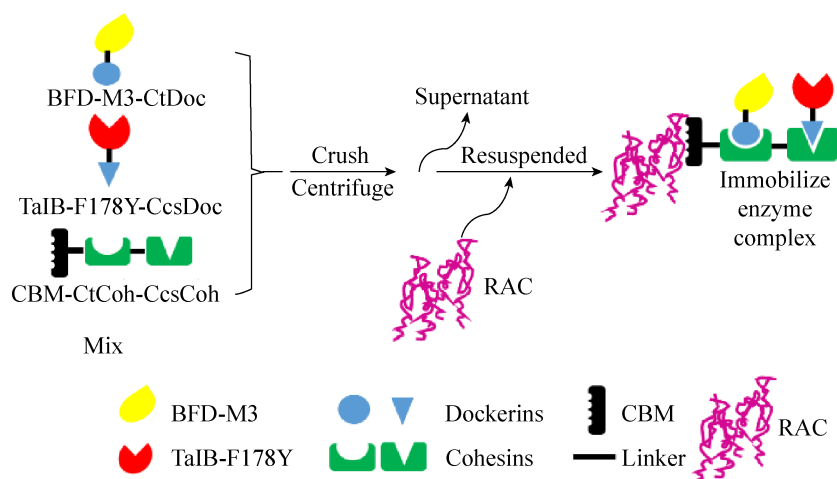


图 1 Scaffold 多酶组装原理图^[22]

Fig. 1 Scaffold Self-Assembly schematic^[22].

1.2.6 酶组装催化反应

酶复合体催化甲醛合成木酮糖。样品 (500 μL): 复合酶浓度为 2 mg/mL, 6–16 g/L 梯度甲醛浓度, 50 mmol/L K_3PO_4 , 5 mmol/L MgSO_4 , 0.5 mmol/L TPP, pH 7.4。反应在振荡反应器进行, 300 r/min, 37 $^\circ\text{C}$ 反应 24 h。

1.2.7 目标产物木酮糖检测

木酮糖检测采用高效液相色谱法 (HPLC)。取 200 μL 反应液 12 000 r/min 离心 2 min, 所得上清液用 0.22 μm 滤器过滤后, 进行 HPLC 检测。

HPLC 检测条件 检测器为 Agilent Technologies 1260 RID (Refractive index detector), 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H Column (300 mm \times 7.8 mm), 进样量 20 μL , 流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 , 柱温 35 $^\circ\text{C}$, 流速 0.6 mL/min。

2 结果与分析

2.1 甲醛合成木酮糖催化途径的设计

糖类是含醛基或酮基的多羟基化合物及其

衍生物的总称。从简单醛酮类化合物出发合成重要糖类及其衍生物, 一直以来受到人们的高度关注。如以羟基乙醛和甲醛为原料合成葡萄糖、木糖和艾杜糖^[24]; 以甲酸为原料途经甲醛合成糖异生的中间产物磷酸二羟丙酮^[19]; 以 DHA 和甘油醛或羟基乙醛为原料合成果糖、木酮糖^[25]等。本研究基于已有研究基础, 设计了一条以最简单醛类化合物甲醛为原料合成木酮糖的生物途径。首先 BFD-M3 聚合 2 分子甲醛形成 1 分子羟基乙醛, 羟基乙醛继续结合 1 分子甲醛形成 DHA, TalB-F178Y 进一步催化羟基乙醛和 DHA 合成木酮糖 (图 2)。为了评价途径的可行性, 利用热力学分析工具 eQuilibrator (<http://equilibrator.weizmann.ac.il/>) 对途径中各反应吉布斯自由能变 $\Delta_r G^m$ 进行计算 (表 2), $\Delta_r G^m$ 依次为 -27.9、-17.7、15.9 kJ/mol。而最终 5 分子甲醛生成 1 分子木酮糖总反应的 $\Delta_r G^m$ 为 -57.6 kJ/mol (<0), 说明在热力学上该反应路线是可行的。

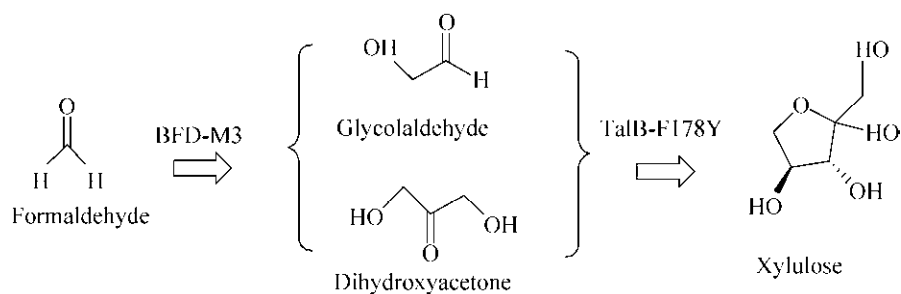


图 2 甲醛到木酮糖催化途径示意图

Fig. 2 Catalytic pathway schematic from formaldehyde to xylulose.

表 2 途径各步反应吉布斯自由能变

Table 2 The $\Delta_r G^m$ of each reaction in the new pathway

Step	Reaction	Flux	$\Delta_r G^m$ (kJ/mol)
1	2 Formaldehyde \rightleftharpoons Glycolaldehyde	2	-27.9
2	Glycolaldehyde + Formaldehyde \rightleftharpoons Dihydroxyacetone	1	-17.7
3	Glycolaldehyde + Dihydroxyacetone \rightleftharpoons Xylulose	1	15.9
Total	5 Formaldehyde \rightleftharpoons Xylulose	1	-57.6

2.2 甲醛合成木酮糖催化途径的构建

为了能够实现甲醛到木酮糖的途径, 首先将本实验室库存质粒 pET28a-*bfd*-M3 与 pET28a-*talB*-F178Y 分别转入 BL21 (DE3) 感受态细胞, 在大肠杆菌中表达并纯化蛋白 (方法 1.2.1)。SDS-PAGE 检测结果 (图 3) 表明 BFD-M3、TalB-F178Y 蛋白的分子量与理论大小一致, 且纯度较高, 电泳专一性达 95% 以上, 因此可用于催化反应。

其次我们采用一锅酶法实现甲醛直接合成木酮糖的生物途径 (甲醛到木酮糖合成途径涉及的单步催化反应均可实现^[20-21])。HPLC 结果显示, 实验组与对照组相比检测到有新峰出现, 且新峰

出峰位置与目标产物木酮糖出峰位置一致, 表明 BFD-M3 和 TalB-F178Y 两酶可以催化甲醛合成木酮糖。虽然可以成功检测到目标产物木酮糖的生成, 但是产量并不高。在 5 g/L 甲醛浓度下, 只有 20 mg/L 木酮糖生成, 转化率为 0.4%。文献调研发现, 已报道的 TalB-F178Y 催化 D,L-甘油醛和 DHA 生成 D-果糖时 $K_m > 120 \text{ mmol/L}$ ^[21], 推测 TalB-F178Y 对 DHA 较低的亲和力是限制甲醛合成木酮糖的主要原因。

2.3 木酮糖合成途径底物浓度的优化

为了检测甲醛底物浓度对反应的影响并提高催化效率, 后续的实验设置了 12 个甲醛浓度梯度进行测试。HPLC 检测结果如图 4 所示: 随着甲醛底物浓度的升高, 木酮糖转化率整体呈上升趋势; 当甲醛浓度为 20 g/L 时, 木酮糖转化率达到 4.6%, 比 5 g/L 甲醛浓度的转化率提高 11.5 倍。实验结果与预期分析一致, 高浓度甲醛在 BFD-M3 催化下生成浓度较高的羟基乙醛和 DHA, 从而促进后续反应的进行。但甲醛浓度增加到 25 g/L 时, 转化率有所下降, 分析原因可能是更高浓度甲醛抑制途径酶活性, 从而影响反应速率。另外, 由于甲醛对酶的毒性, 催化反应选择 20 g/L 以内甲醛底物浓度较为合适。

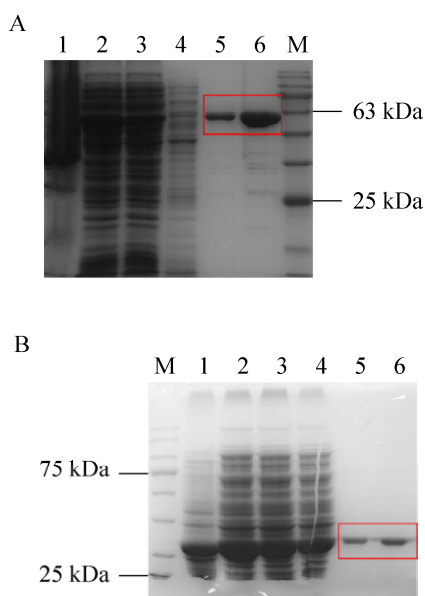


图 3 镍亲和层析纯化 BFD-M3 和 TalB-F178Y

Fig. 3 Purification of BFD-M3 and TalB-F178Y by Ni-NTA affinity chromatography. (A) Protein BFD-M3. lane 1: precipitation samples in the cell lysates; lane 2: supernatant samples in the cell lysates; lane 3: supernatant flow through Ni-NTA affinity chromatography; lane 4-6: 50, 100, 200 mmol/L imidazole eluent. lane M: protein marker. (B) Protein TalB-F178Y. lane M: protein marker; lane 1: precipitation samples in the cell lysates; lane 2: supernatant samples in the cell lysates; lane 3: supernatant flow through Ni-NTA affinity chromatography; lane 4-6: 50, 200, 300 mmol/L imidazole eluent.

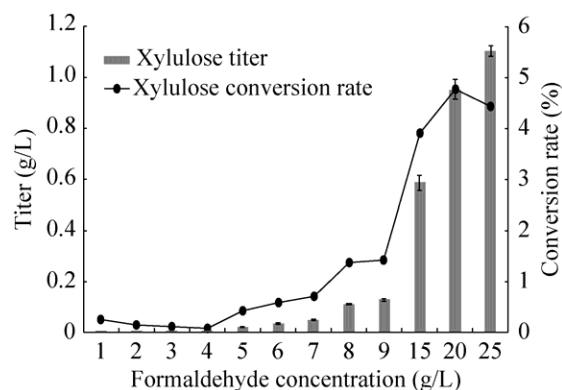


图 4 一锅酶法在不同的甲醛浓度下合成木酮糖

Fig. 4 One-pot enzyme-catalyzed synthesis of xylulose under different concentration of formaldehyde.

2.4 结合多酶组装技术合成木酮糖

为进一步提高木酮糖的产量,本研究结合 Scaffold 多酶组装技术,利用 Scaffold 蛋白支架固定 BFD-M3、TalB-F178Y 蛋白,得到反应复合酶体系。Scaffold 多酶组装技术的使用,理论上可以提高复合酶体系催化中心局部羟基乙醛和 DHA 浓度,进而提高木酮糖转化率。首先,分别在 BFD-M3、TalB-F178Y 蛋白 C 端添加 Scaffold 配体,所构建重组质粒 pET28a-*bfd*-M3-ctdoc、pET28a-*talB*-F178Y-ccsdoc、pET20b-*cbm-scaf* 见图 5,然后利用复合酶组装技术获得复合酶反应液(方法 1.2.5)。利用等同浓度的复合酶催化 6–16 g/L

梯度浓度的甲醛,进行 HPLC 检测,结果如图 6 所示。随着甲醛浓度的升高,木酮糖产量逐渐提高;当甲醛浓度为 16 g/L 时,木酮糖产量达到 2.20 g/L,木酮糖转化率为 13.75%;当甲醛浓度为 14 g/L 时,甲醛到木酮糖的产量为 1.96 g/L,低于 16 g/L 甲醛浓度的产量,但此时转化率却达到最高,是未固定化前最高转化率的 3 倍,达到 14.02%。酶的特性是影响途径反应速率的核心因素,本研究通过将酶组装固定间接提高催化中心局部底物浓度的策略,使得反应效率明显提高。因此要获得更高的木酮糖产量,需进一步对关键酶进行改造,提高对底物亲和性。

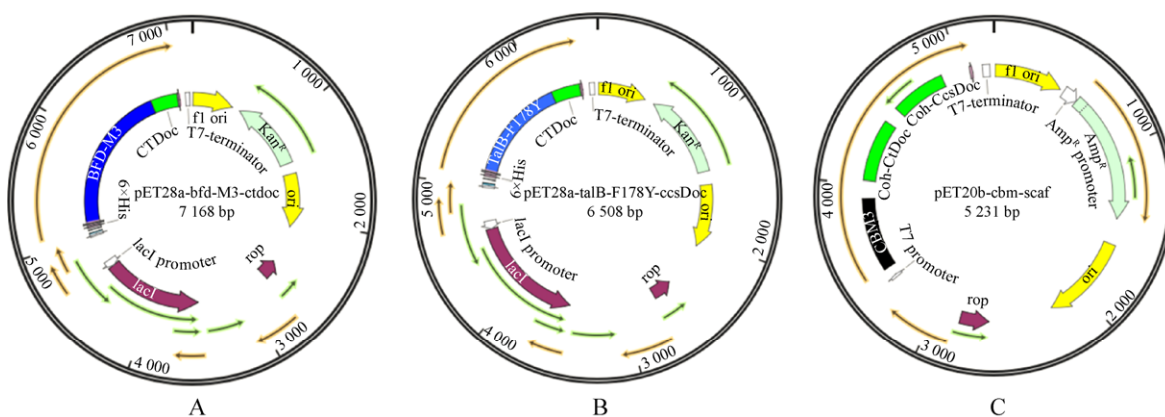


图 5 重组质粒图谱 (Scaffold 配体)

Fig. 5 Recombinant plasmids with Scaffold cohesion. (A) Recombinant plasmid pET28a-*bfd*-M3-ctdoc. (B) Recombinant plasmid pET28a-*talB*-F178Y-ccsdoc. (C) Recombinant plasmid pET20b-*cbm-scaf*.

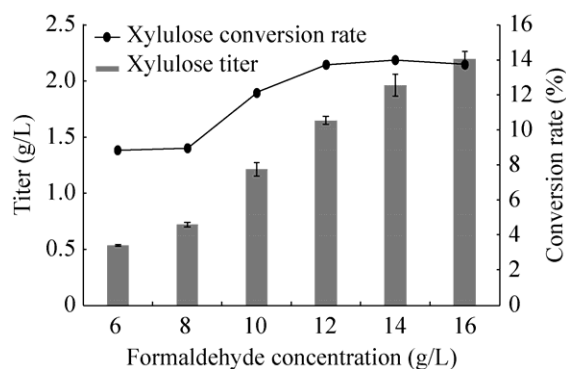


图 6 多酶组装技术在不同的甲醛浓度下合成木酮糖
Fig. 6 The synthesis of xylulose by Scaffold Self-Assembly technique under different concentration of formaldehyde.

3 结论

一碳化合物作为很有应用前景的绿色能源物质,从一碳化合物出发合成多碳有机分子得到越来越多的关注。甲醛作为最基本有机原料之一,来源广泛且容易获得。木酮糖是生物体中间代谢产物,其独特的生物活性在不同领域发挥着重要作用。鉴于此,以甲醛为底物设计一条新的甲醛-木酮糖生物合成途径具有重要的意义。本研究设计的甲醛到木酮糖的新途径通过两酶催化底物实现:首先 BFD-M3 催化甲醛生成羟基乙醛和

DHA, TalB-F178Y 再将羟基乙醛和 DHA 聚合形成木酮糖。通过在大肠杆菌中过表达 BFD-M3 和 TalB-F178Y 两个蛋白,采用一锅酶法催化甲醛生成木酮糖,但转化率只有 0.4%左右。经过对甲醛底物浓度进行优化,木酮糖转化率提高了 11.5 倍,达到 4.6%。为进一步提高木酮糖转化率,采用 Scaffold 多酶组装技术将两个蛋白 BFD-M3、TalB-F178Y 组装固定后进行催化反应。当甲醛浓度为 14 g/L 时,木酮糖转化率达 14.02%,较固定化之前最高转化率提高 3 倍。前期研究表明 TalB-F178Y 与底物 DHA 亲和力很低(约 120 mmol/L)^[21],可能是限制木酮糖转化的主要原因之一。为了进一步提高木酮糖转化率,在后续的研究中,可以通过酶定向进化的方法,提高酶对底物亲和性。

本研究中的合成木酮糖新途径,较已有的合成方法更加简单、方便,节约成本和时间,为其其他稀有糖的合成提供新思路。途径设计以甲醛为底物,为一碳资源的利用和新途径的设计奠定一定的理论基础,同时也为生物制造原料来源提供一种新的可能,为解决生物化工与煤化工(甲醛生产)产业衔接问题提供新思路,对于突破现有生物技术发展瓶颈具有重要意义。

REFERENCES

- [1] Metz B, Mojzita D, Herold S, et al. A novel L-xylulose reductase essential for L-arabinose catabolism in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry*, 2013, 52(14): 2453–2460.
- [2] Carius Y, Christian H, Faust A, et al. Structural insight into substrate differentiation of the sugar-metabolizing enzyme galactitol dehydro-genase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 20006–20014.
- [3] Cheng HR, Li ZL, Jiang N, et al. Cloning, purification and characterization of an NAD-dependent D-arabitol dehydrogenase from acetic acid bacterium, *Acetobacter suboxydans*. *Protein J*, 2009, 28(6): 263–272.
- [4] Granström TB, Takata G, Morimoto K, et al. L-xylose and L-lyxose production from xylitol using *Alcaligenes* 701B strain and immobilized L-rhamnose isomerase enzyme. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 36(7): 976–981.
- [5] Park CS, Yeom SJ, Lim YR, et al. Substrate specificity of a recombinant ribose-5-phosphate isomerase from *Streptococcus pneumoniae* and its application in the production of L-lyxose and L-tagatose. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(4): 743–750.
- [6] Granström TB, Takata G, Tokuda M, et al. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *J Biosci Bioeng*, 2004, 97(2): 89–94.
- [7] Meng Q, Zhang T, Jiang B, et al. Advances in applications, metabolism, and biotechnological production of L-xylulose. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(2): 535–540.
- [8] McCormick DB, Touster O. The conversion *in vivo* of xylitol to glycogen via the pentose phosphate pathway. *J Biol Chem*, 1957, 229(1): 451–461.
- [9] Anderson RL, Wood WA. Pathway of L-xylose and L-lyxose degradation in *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem*, 1962, 237: 296–303.
- [10] Larson HW, Blatherwick NR, Bradshaw PJ, et al. The metabolism of L-xylulose. *J Biol Chem*, 1941, 138: 353–360.
- [11] St-cyr A, Légaré C, Frenette GC, et al. P26h and dicarbonyl/L-xylulose reductase are two distinct proteins present in the hamster epididymis. *Mol Reprod Dev*, 2004, 69(2): 137–145.
- [12] El-Kabbani O, Ishikura S, Darmanin C, et al. Crystal structure of human L-xylulose reductase holoenzyme: probing the role of Asn107 with site-directed mutagenesis. *Proteins: Struct Funct Bioinf*, 2004, 55(3): 724–732.
- [13] Weyda I, Lübeck M, Ahring BK, et al. Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius*. *J Ind Microbiol Biot*, 2014, 41(4): 733–739.
- [14] Liu CJ, Xu GH. C1 chemical products and trend of development. *Chin J Chem Eng*, 2003, 54(4): 524–530 (in Chinese).
刘昌俊, 许根慧. 一碳化工产品及其发展方向. *化工学报*, 2003, 54(4): 524–530.

- [15] Whitaker WB, Jones JA, Bennett RK, et al. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2017, 39: 49–59.
- [16] Müller JEN, Meyer F, Litsanov B, et al. Engineering *Escherichia coli* for methanol conversion. *Metab Engineering*, 2015, 28: 190–201.
- [17] Antonovsky N, Gleizer S, Noor E, et al. Sugar synthesis from CO₂ in *Escherichia coli*. *Cell*, 2016, 166(1): 115–125.
- [18] Liao JC, Mi L, Pontrelli S, et al. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(5): 288–304.
- [19] Siegel JB, Smith AL, Poust S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(12): 3704–3709.
- [20] Jiang HF, Liu YW, Lu XY, et al. Catalytic formaldehyde synthesis of glycolaldehyde and its application: China, 106916794, 2017-02-22 (in Chinese).
江会锋, 刘玉万, 逯晓云, 等. 催化甲醛合成羟基乙醛的酶及其应用: 中国, 106916794, 2017-02-22.
- [21] Schneider S, Gutiérrez M, Sandalova T, et al. Redesigning the active site of transaldolase TalB from *Escherichia coli*: new variants with improved affinity towards nonphosphorylated substrates. *ChemBioChem*, 2010, 11(5): 681–690.
- [22] You C, Zhang YHP. Self-assembly of synthetic metabolons through synthetic protein scaffolds: one-step purification, co-immobilization, and substrate channeling. *ACS Synth Biol*, 2012, 2(2): 102–110.
- [23] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215–1220.
- [24] Szekrenyi A, Garrabou X, Parella T, et al. Asymmetric assembly of aldose carbohydrates from formaldehyde and glycolaldehyde by tandem biocatalytic aldol reactions. *Nat Chem*, 2015, 7(9): 724–729.
- [25] Schneider S, Sandalova T, Schneider G, et al. Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose-6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 30064–30072.

(本文责编 郝丽芳)