

• 食品生物技术 •

类芽孢杆菌来源 D-甘露醇氧化酶的性质及制备 D-甘露糖的应用

李冉¹, 宋聪¹, 张翔¹, 贾振华^{1,2*}

1 河北省科学院生物研究所, 河北 石家庄 050000

2 河北省微生物研究所有限公司, 河北 保定 071000

李冉, 宋聪, 张翔, 贾振华. 类芽孢杆菌来源 D-甘露醇氧化酶的性质及制备 D-甘露糖的应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(11): 4682-4693.

LI Ran, SONG Cong, ZHANG Xiang, JIA Zhenhua. Characterization of a D-mannitol oxidase from *Paenibacillus* sp. and its application in the preparation of D-mannose[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(11): 4682-4693.

摘要: D-甘露糖具有多种功能活性, 在食品、医药、农业等行业应用广泛。D-甘露醇氧化酶可以高效地将 D-甘露醇转化为 D-甘露糖, 在 D-甘露糖的酶法制备中具有应用潜力。从类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp.) HGF5 中发掘出一个 D-甘露醇氧化酶(PsOX), 与天蓝链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 来源的 D-甘露醇氧化酶(AldO)氨基酸序列相似性为 50.94%, 分子量约为 47.4 kDa, 构建了重组表达质粒 pET-28a-PsOX 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, PsOX 对 D-甘露醇的 K_m 、 k_{cat}/K_m 值分别为 5.6 mmol/L、0.68 L/(s·mmol), 最适 pH 和温度分别为 7.0 和 35 °C, 在 60 °C 以下保持稳定。PsOX 对 400 mmol/L D-甘露醇的摩尔转化率为 95.2%。利用 PsOX 与 AldO 全细胞分别催化 73 g/L D-甘露醇, PsOX 反应 9 h 后反应完全, 生成 70 g/L D-甘露糖, 相较于 AldO 具有更高的催化效率。PsOX 作为新型 D-甘露糖氧化酶为 D-甘露糖的酶法制备提供了依据。

关键词: D-甘露糖; D-甘露醇氧化酶; 酶学性质; 全细胞催化

资助项目: 河北省科学院科技计划项目(22313); 河北省省级科技计划(20372803D)

This work was supported by the Science and Technology Program of Hebei Academy of Sciences (22313) and the S&T Program of Hebei (20372803D).

*Corresponding author. E-mail: zhenhuaj@hotmail.com

Received: 2023-02-06; Accepted: 2023-07-14

Characterization of a D-mannitol oxidase from *Paenibacillus* sp. and its application in the preparation of D-mannose

LI Ran¹, SONG Cong¹, ZHANG Xiang¹, JIA Zhenhua^{1,2*}

¹ Institute of Biology, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang 050000, Hebei, China

² Hebei Research Institute of Microbiology Co., Ltd., Baoding 071000, Hebei, China

Abstract: D-mannose has many functional activities and is widely used in food, medicine, agriculture and other industries. D-mannitol oxidase that can efficiently convert D-mannitol into D-mannose has potential application in the enzymatic preparation of D-mannose. A D-mannitol oxidase (PsOX) was found from *Paenibacillus* sp. HGF5. The similarity between PsOX and the D-mannitol oxidase (AldO) from *Streptomyces coelicolor* was 50.94%. The molecular weight of PsOX was about 47.4 kDa. A recombinant expression plasmid pET-28a-PsOX was constructed and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). The K_m and k_{cat}/K_m values of PsOX for D-mannitol were 5.6 mmol/L and 0.68 L/(s·mmol). Further characterization of PsOX showed its optimal pH and temperature were 7.0 and 35 °C, respectively, while its enzyme activity could be stably remained below 60 °C. The molar conversion rate of 400 mmol/L D-mannitol by PsOX was 95.2%. The whole cells of PsOX and AldO were used to catalyze 73 g/L D-mannitol respectively. The reaction catalyzed by PsOX completed in 9 h and 70 g/L D-mannose was produced. PsOX showed a higher catalytic efficiency compared to that of AldO. PsOX may facilitate the enzymatic preparation of D-mannose as a novel D-mannose oxidase.

Keywords: D-mannose; D-mannitol oxidase; enzyme property; whole cell catalysis

D-甘露糖是一种单糖，在自然界中分布广泛，植物、植物细胞壁及果皮中普遍含有具有 D-甘露糖单元的多糖和游离的 D-甘露糖^[1-2]。因其具有低甜度、低热量的特点，相较蔗糖更有益于人们身体健康，常作为蔗糖替代品应用于食品工业^[2]。此外，甘露糖可用于预防尿道感染药物，还可用作糖质营养素来应对糖尿病和肥胖症等疾病，具有抗炎、免疫调节等功能^[3-4]。在化工领域可作为合成三氟甘露糖、甘露糖醇以及 L-核糖等的合成前体^[5-7]。

目前 D-甘露糖的制备方法有提取法、化学合成法和生物转化法。提取法主要以咖啡渣、棕榈籽为原料^[8-9]，通过水解、分离纯化等步骤获得 D-甘露糖。从咖啡渣中提取 D-甘露糖的产

率达 60%以上，纯度达 98%以上^[8]，但是提取法往往需要大量植物原料，而且生产制备受地域、季节的影响。化学合成法是通过 D-葡萄糖差向异构化来获得 D-甘露糖，转化率为 30%–36%，反应条件常需要在酸性 (pH 2.3–4.5)、高温 (110–160 °C) 环境中进行^[10]，存在转化率低、生产工艺复杂、成本较高等问题。

生物转化法因其具有反应条件温和、对环境友好等优点而受到广泛的关注，利用生物转化法制备 D-甘露糖成为研究热点。目前通过某些异构酶，如 D-甘露糖异构酶 (D-mannose isomerase, EC 5.3.1.7)、D-来苏糖异构酶 (D-lyxose isomerase, EC 5.3.1.15) 能够实现将 D-果糖转化为 D-甘露糖的过程，转化率在 12%–25% 之间^[11-13]。由于

D-果糖价格略高于 D-葡萄糖, 为进一步降低成本, 研究者采用纤维二糖 2-差向异构酶 (cellobiose 2-epimerase, Cease, EC 5.1.3.11)催化的方式由 D-葡萄糖合成 D-甘露糖, 转化率约为 15%^[14]。还有研究者采用双酶催化的方式, 利用 D-葡萄糖异构酶(D-glucose isomerase, EC 5.3.1.5)与 D-甘露糖异构酶或 D-来苏糖异构酶催化 D-葡萄糖合成 D-甘露糖, 转化率分别约为 12%、15%、14%^[11,15-16]。目前报道中的异构酶催化反应为可逆反应, 导致转化效率不高, 且副产物较多。

为提高生物转化法合成 D-甘露糖的转化效率, 以 D-甘露醇为底物, 利用 D-甘露醇氧化酶 (D-mannitol oxidase, EC 1.1.3.40)合成 D-甘露糖为不可逆反应, 能够完全将 D-甘露醇转化为 D-甘露糖, 有效提高 D-甘露糖产率。来源于天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)的 AldO 是一种已知的能够催化 D-甘露醇合成 D-甘露糖的糖醇氧化酶^[17-18], 本研究从 NCBI 数据库中挖掘出一个来源于类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp. HGF5)的氧化酶 PsOX (GenBank 登录号为 WP_009593092.1), 将 PsOX 与 AldO 的氨基酸序列进行比对, 发现 PsOX 具有与 AldO 相同的底物结合位点, 推测其具有 D-甘露糖的催化活性。将 PsOX 与 AldO 蛋白编码基因分别在大肠杆菌中表达, 研究 PsOX 酶学性质, 比较 PsOX 与 AldO 的重组全细胞在制备 D-甘露糖时的催化效率, 以期 D-甘露糖的酶法生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

实验室所用菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司。表达载体 pET-28a(+)为实验

室保藏。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, pH 为 7.0。卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL。

LB 固体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂粉 15.0, pH 为 7.0。卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL。

1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准和蛋白分子量标准购自北京全式金生物技术有限公司; 质粒 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; IPTG、D-甘露醇、D-甘露糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 4-氨基安替比林、3,5-二氯-2-羟基苯磺酸钠、辣根过氧化物酶购自罗恩试剂。

pH 计, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; UV-2600 紫外分光光度计, 岛津公司; 精密天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; 超声破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 核酸电泳仪、蛋白电泳设备、凝胶成像系统和 Aminex HPX-87H 色谱柱, Bio-Rad 公司; 高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)、示差折光检测器(differential refractive index detector, RID), 岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 PsOX、AldO 原核表达载体构建

将 PsOX (GenBank 登录号为 WP_009593092.1)、AldO (GenBank 登录号为 WP_011030685.1)的蛋白质序列委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行偏向于大肠杆菌的密码子优化并合成, 优化的基因序列两端添加 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点。将含有目的片段的质粒及载体质粒利用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点双酶切, PsOX、

AldO 分别连入 pET-28a(+), 构建得到重组质粒 pET28a-PsOX、pET28a-AldO, 转化 *E. coli* BL21(DE3) 得到重组菌株 *E. coli* BL21-pET28a-PsOX、*E. coli* BL21-pET28a-AldO。

1.2.2 PsOX、AldO 重组蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3), 挑取单菌落接种至 LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素)中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养。以 0.1% 的接种量转接到 LB 液体培养基(含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 14 h, 测定菌液 OD_{600} 数值。诱导后的菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心后, 用 2 mL 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0)重悬, 置于冰水浴中, 超声波功率为 200 W 进行细胞破碎。细胞破碎液经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min 后, 上清液即为粗酶液, 将上清液利用亲和层析镍柱进行纯化, 得到纯酶液。细胞破碎液、纯酶液利用 SDS-PAGE 进行检测。

1.2.3 PsOX 酶活力及酶动力学常数测定

酶活力测定方法: 反应体系(1 mL)中含 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0), 300 mmol/L D-甘露醇。加入 100 μL 纯酶液起始反应, 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 反应 10 min, 反应液 12 000 r/min 离心 5 min, 取 100 μL 反应液加入 5 mmol/L 硫酸溶液中, 过 0.22 μm 水相膜后, 利用液相色谱检测 D-甘露糖含量。液相色谱检测条件: 色谱柱为 Aminex HPX-87H (300 mm \times 7.8 mm), 柱温箱为 40 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速为 0.5 mL/min, 检测器为 RID 检测器。酶活力定义为: 每分钟生成 1 μmol 的 D-甘露糖所需酶量定义为一个酶活力单位(U)。蛋白含量使用 Abbkine 公司快速蛋白质定量试剂盒进行测定。

酶动力学常数测定参照 Heuts 等的方法^[17],

反应体系包括 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0), 3 U/mL 辣根过氧化物酶, 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 纯酶液, 分别加入 5、10、50、100、200 mmol/L D-甘露醇, 置于 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床中反应 15 min, 加入 0.1 mmol/L 4-氨基安替比林, 1 mmol/L 3,5-二氯-2-羟基苯磺酸钠, 利用 UV-2600 紫外分光光度计测定 515 nm 处吸光度值变化, 利用 UVProbe 软件计算 K_m 值、 k_{cat} 值。

1.2.4 温度对 PsOX 酶活力的影响

最适温度测定: 将 1.2.3 述反应体系分别加入 30 OD_{600}/mL 粗酶液, 在 20、25、30、35、40、45、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中, 200 r/min 反应 3 h。利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测各 pH 下 D-甘露糖的生成量, 将 D-甘露糖的生成量最高时的酶活力设为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活力。

温度稳定性测定: 将 30 OD_{600}/mL 粗酶液在 20、25、30、35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 h 后加入到反应体系中, 在最适条件下测定残余酶活力, 以未经处理酶液的酶活力为对照, 分别计算各温度的残余酶活力占对照组酶活力的百分比。

1.2.5 pH 对 PsOX 酶活力的影响

将 1.2.3 所述反应体系中的缓冲液分别换成柠檬酸/柠檬酸钠(pH 5.0–6.0)、磷酸氢二钾/磷酸二氢钾(pH 6.0–7.5)、Tris-HCl (pH 7.5–8.5)。反应 1 h 后, 利用 HPLC 检测各 pH 下 D-甘露糖的生成量, 将 D-甘露糖的生成量最高时的酶活力设为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活力。

1.2.6 PsOX 重组菌全细胞催化反应条件优化

全细胞转化反应体系为: 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0), 300 mmol/L D-甘露醇, 设置菌体浓度分别为 10、20、30、40 OD_{600}/mL , 反应 9 h 后 12 000 r/min 离心 5 min, 分别取 100 μL 上清液加入 5 mmol/L 硫

酸终止反应,利用 HPLC 检测 D-甘露糖的含量,计算转化率。

设置底物浓度分别为 200、300、400、500 mmol/L D-甘露醇,加入 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0),30 OD_{600}/mL 全细胞,反应 9 h 后 12 000 r/min 离心 5 min,分别取 100 μL 上清液加入 5 mmol/L 硫酸终止反应,利用 HPLC 检测 D-甘露糖的含量,计算转化率。

设置底物浓度为 200、300、400、500 mmol/L D-甘露醇,加入 50 mmol/L 磷酸氢二钾/磷酸二氢钾缓冲液(pH 7.0),30 OD_{600}/mL 全细胞、10 U/mL 的辣根过氧化物酶,反应 9 h 后 12 000 r/min 离心 5 min,分别取 100 μL 上清液加入 5 mmol/L 硫酸终止反应,利用 HPLC 检测 D-甘露糖的含量,计算转化率。

1.2.7 PsOX、AldO 全细胞催化合成 D-甘露糖的比较

将 30 OD_{600}/mL 的 PsOX、AldO 全细胞、10 U/mL 的辣根过氧化物酶,分别加入 D-甘露醇浓度为 73 g/L 的 80 mL 反应体系,置于 500 mL 挡板摇瓶中 35 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 反应,定时从反应

体系中取样,使用 HPLC 检测不同取样时间的 D-甘露醇、D-甘露糖含量。

1.2.8 PsOX、AldO 全细胞在发酵罐中的催化反应

将 30 OD_{600}/mL 的 PsOX、AldO 全细胞、10 U/mL 的辣根过氧化物酶,分别加入 D-甘露醇浓度为 73 g/L 的 1 L 反应体系,置于 3 L 发酵罐中 35 $^{\circ}\text{C}$,串联搅拌控制溶氧值 30%–50% 搅拌反应,定时从反应体系中取样,使用 HPLC 检测不同取样时间的 D-甘露醇、D-甘露糖含量。

2 结果与分析

2.1 PsOX、AldO 序列比对分析

在 NCBI 数据库中发掘到一条来源于类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)的氧化酶蛋白质序列,该蛋白质序列含有 419 个氨基酸,预测分子量和等电点 pI 分别为 47.4 kDa 和 6.19。天蓝链霉菌(*S. coelicolor*)的糖醇氧化酶 AldO 对苏糖醇、木糖醇、D-山梨醇和 D-甘露醇均有催化活性,AldO 与底物拟合结果表明 Glu320、Arg322、Ser106、Lys375、His343、Thr345 为底物结合活性位点^[17-18]。将 PsOX 与 AldO 蛋白质序列比对(图 1),其蛋白质序列的相似性为 50.94%,

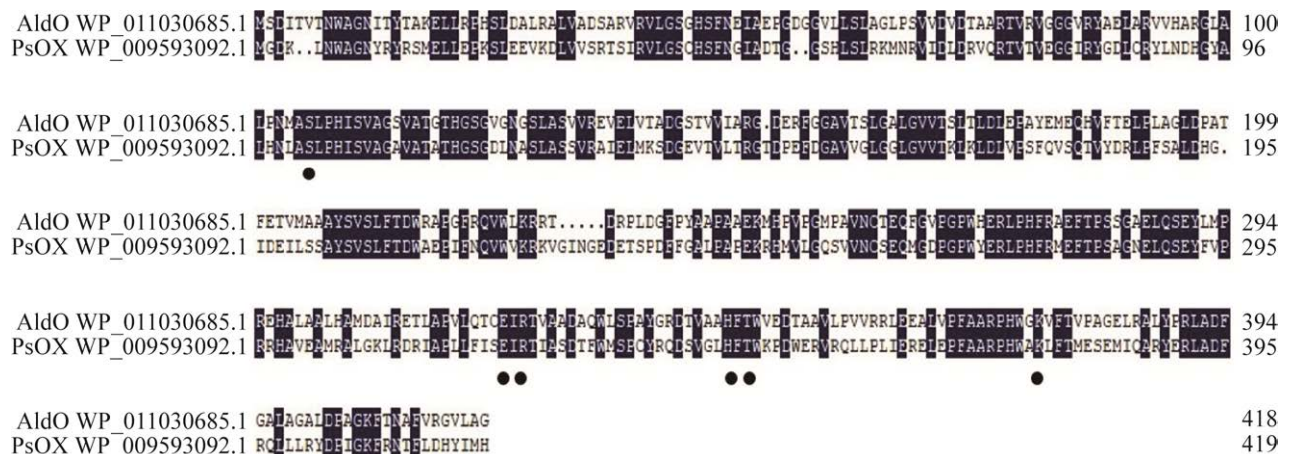


图 1 PsOX 与 AldO 的氨基酸序列比对 与底物结合相关的残基用圆点标注

Figure 1 Alignment of amino acid sequences of PsOX and AldO. Residues related to substrate binding are highlighted by circles.

PsOX 具有与 AldO 底物结合活性位点一致的氨基酸位点, 因此推测 PsOX 具有 D-甘露醇催化活性。

2.2 PsOX、AldO 的重组蛋白表达与催化活性检测

将 PsOX 与 AldO 基因分别在大肠杆菌中重组表达, 取全细胞破碎液进行 SDS-PAGE 检测, PsOX 与 AldO 均有可溶性表达, PsOX 重组蛋白经镍株纯化后得到纯酶液(图 2)。液相色谱检测结果(图 3)表明, D-甘露醇标准品出峰时间约 11.5 min, D-甘露糖标准品出峰时间约 11.1 min, PsOX 反应液中检测到 D-甘露糖, 表明 PsOX 具有催化活性。

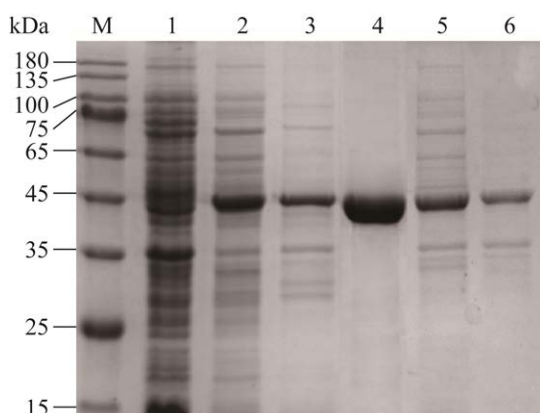


图 2 PsOX 与 AldO 重组蛋白表达的 SDS-PAGE 分析 M: 标准蛋白; 1: 未诱导细胞破碎液; 2: *Escherichia coli* BL21-pET28a-PsOX 细胞破碎液上清; 3: *E. coli* BL21-pET28a-PsOX 细胞破碎液沉淀; 4: PsOX 纯酶液; 5: *E. coli* BL21-pET28a-AldO 细胞破碎液上清; 6: *E. coli* BL21-pET28a-AldO 细胞破碎液沉淀

Figure 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant PsOX and AldO. M: Standard protein marker; 1: Uninduced whole-cell extracts; 2: *Escherichia coli* BL21-pET28a-PsOX whole-cell extracts supernatant; 3: *E. coli* BL21-pET28a-PsOX whole-cell extracts sediment; 4: Purified PsOX; 5: *E. coli* BL21-pET28a-AldO whole-cell extracts supernatant; 6: *E. coli* BL21-pET28a-AldO whole-cell extracts sediment.

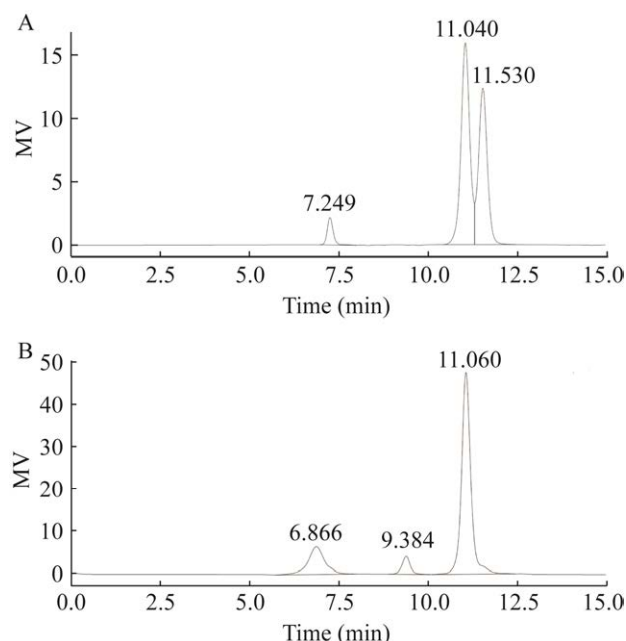


图 3 *Escherichia coli* BL21-pET28a-PsOX 全细胞催化活性液相检测图 A: D-甘露醇、D-甘露糖标准品液相图. B: *E. coli* BL21-pET28a-PsOX 全细胞转化 D-甘露醇液相图

Figure 3 The HPLC profile showing the catalytic activity of *Escherichia coli* BL21-pET28a-PsOX recombinant cells. The HPLC profile of mixed standard sample of D-mannitol, D-mannose (A) and D-mannitol catalyzed by *E. coli* BL21-pET28a-PsOX (B).

2.3 PsOX 的酶活力与酶动力学常数

测定了 PsOX 纯酶液的酶活力为 34.3 U/mg, 对 PsOX 的酶动力学常数进行测定, 结果如表 1 所示, PsOX 对 D-甘露醇的 K_m 值为 5.6 mmol/L, 低于 AldO 对 D-甘露醇的 K_m 值, 表明 PsOX 对 D-甘露醇的亲合度更高。PsOX 的 k_{cat}/K_m 值为 0.68, 高于 AldO 的 k_{cat}/K_m 值, 表明 PsOX 对 D-甘露醇的催化效率更高。

2.4 温度对 PsOX 酶活力的影响

温度是酶促反应的重要影响因素, 特别是对酶活力的影响。温度对 PsOX 的酶活力影响如图 4A 所示, PsOX 的最适温度为 35 °C, 在

表 1 PsOX 和 AldO 的酶动力学常数

Table 1 Steady-state kinetic parameters for PsOX and AldO

	Substrate	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (L/(s·mmol))
PsOX	D-mannitol	5.6	3.8	0.68
AldO ^[17]	D-mannitol	36±2	9.2±0.2	0.26

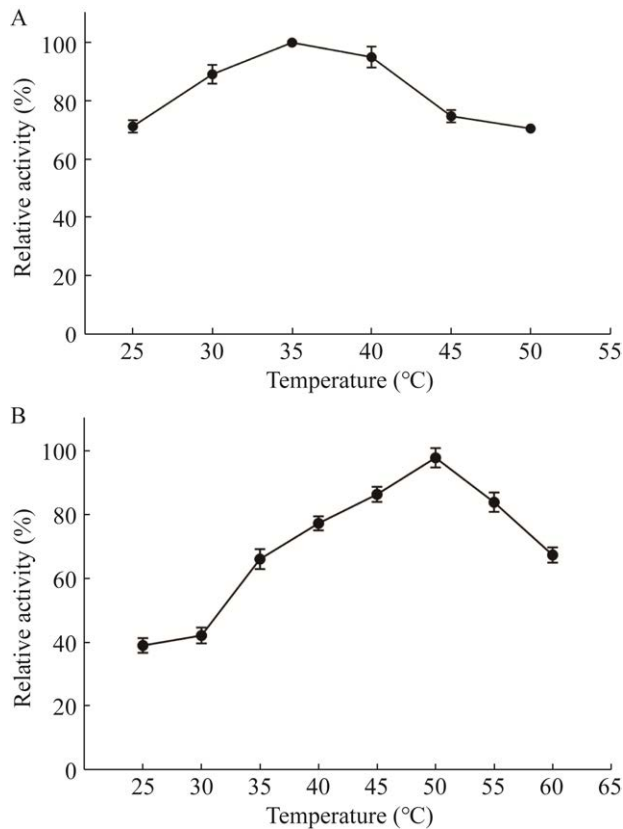


图 4 温度对 PsOX 酶活性的影响 A: PsOX 的最适温度. B: PsOX 的温度稳定性

Figure 4 Effect of temperatures on the activity of PsOX. The optimal temperature (A) and thermostability (B) of PsOX.

25–50 °C时, PsOX 的酶活力可保持最高活性的 60%以上。PsOX 在不同温度孵育 1 h 后测定其热稳定性情况, 如图 4B 所示, 在 35–60 °C时, PsOX 的酶活力能保持在最高活性的 60%以上。

2.5 pH 对 PsOX 酶活力的影响

反应体系的 pH 也是影响酶活力的重要因

素。PsOX 在不同 pH 反应液中的酶活力如图 5 所示, PsOX 的最适 pH 为 7.0, 在 pH 为 7.0–7.5 时可保持最高活性的 60%以上, pH 为 6.0–8.5 时可保持最高活性的 40%以上, pH 为 5.5 以下时 PsOX 没有活性。

2.6 PsOX 全细胞催化反应条件优化

为确定 PsOX 全细胞催化的最适菌量, 检测了添加不同菌量时的 D-甘露糖含量和转化率 (图 6A), 结果表明菌量为 30 OD_{600}/mL , 甘露糖含量和摩尔转化率最高, 分别为 284 mmol/L、94.7%, 菌量为 40 OD_{600}/mL 时, 甘露糖含量有所下降, 可能与菌体对甘露醇的消耗有关, 因此反应体系的最适菌体全细胞添加量为 30 OD_{600}/mL 。

为确定反应的最适底物浓度, 在反应体系中加入不同浓度的 D-甘露醇, 检测 D-甘露糖的含量和转化率, 结果如图 6B 所示, D-甘露糖含量随底物浓度增加而增加, D-甘露醇浓度为 400 mmol/L 以上时, D-甘露醇不能完全反应, 摩尔转化率为 78.1%; D-甘露醇浓度为 300 mmol/L 时, D-甘露糖含量为 286 mmol/L, D-甘露醇反应完全, 摩尔转化率为 95.4%。

反应产生的过氧化氢可能影响细胞的催化活性, 为减少反应中产生的过氧化氢对转化效

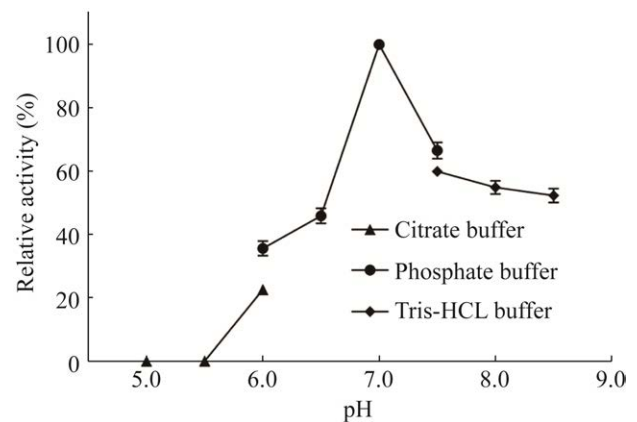


图 5 pH 对 PsOX 酶活性的影响

Figure 5 Effect of pH on the activity of PsOX.

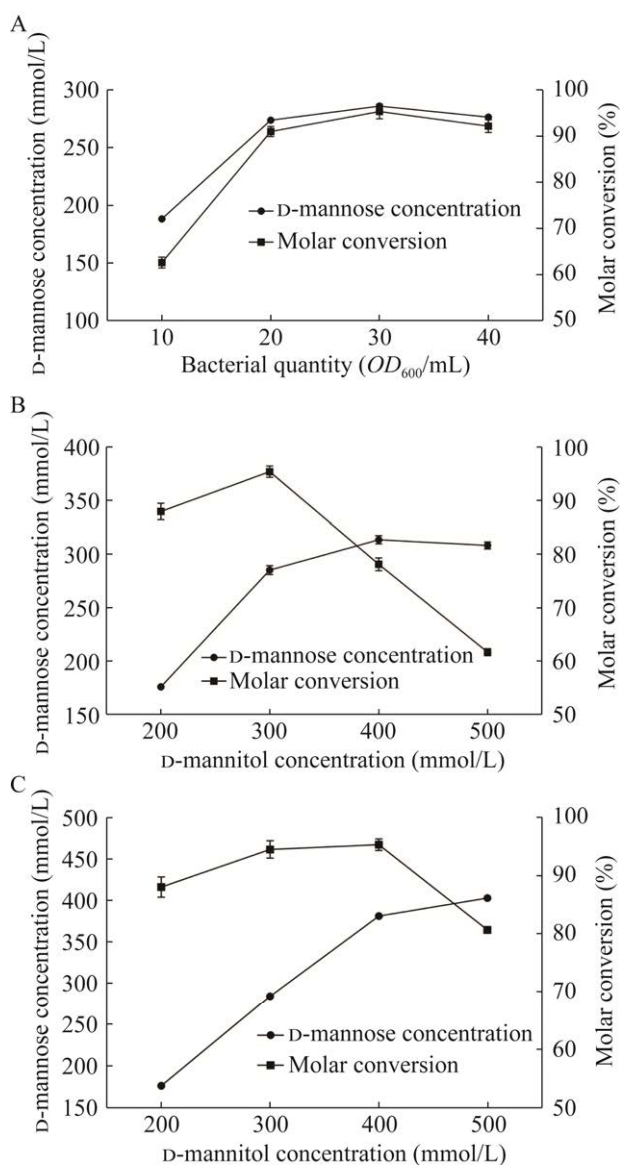


图6 菌量(A)、D-甘露醇浓度(B)、过氧化氢酶(C)对PsOX全细胞生产D-甘露糖的影响

Figure 6 Effects of biomass amount (A), D-mannitol concentration (B), catalase (C) on D-mannose production catalyzed by whole cell containing PsOX.

率的影响,在反应中加入辣根过氧化物酶以消解过氧化氢,检测不同底物浓度时D-甘露糖的含量及摩尔转化率,结果如图6C所示。添加过氧化氢酶后,PsOX全细胞能将400 mmol/L D-甘露醇完全转化,产生的D-甘露糖浓度为

381 mmol/L,摩尔转化率为95.2%。

2.7 PsOX、AldO全细胞催化合成D-甘露糖的比较

将PsOX、AldO全细胞置于挡板摇瓶中进行催化反应,D-甘露醇、D-甘露糖浓度随时间变化如图7A、7B所示,D-甘露醇浓度为73 g/L(400 mmol/L)时,PsOX反应9 h时,D-甘露醇完全反应,D-甘露糖浓度为70 g/L,转化率为95.9%。AldO反应24 h时,无法将D-甘露醇完全转化,D-甘露糖浓度为22 g/L,转化率为30%。将PsOX、AldO全细胞置于3 L发酵罐中进一步扩大反应规模,结果如图7C、7D所示,PsOX全细胞转化反应12 h后,无D-甘露醇剩余,D-甘露糖浓度为69.6 g/L,转化率为95.3%。AldO仍然无法将D-甘露醇完全转化,转化率为32.3%。

3 讨论与结论

氧化酶在手性砌块化合物的合成中应用广泛,针对目前已报道的通过异构酶合成D-甘露糖转化率较低的问题,本研究以氧化酶作为关键酶催化D-甘露醇合成D-甘露糖,以提高转化效率。从类芽孢杆菌中发掘到一个氧化酶PsOX,与已报道的来源于天蓝链霉菌的氧化酶AldO具有相同的底物催化活性位点,推测其具有D-甘露醇的催化活性。将PsOX与AldO分别在大肠杆菌中异源表达,PsOX与AldO均有可溶性蛋白表达,催化活性检测表明PsOX能够催化D-甘露醇合成D-甘露糖。PsOX对D-甘露醇的 K_m 、 k_{cat}/K_m 值分别为5.6、0.68,相较于AldO表现出更高的底物亲和性和催化效率。PsOX的酶学性质研究表明,其最适pH与最适温度分别为7.0、35℃,在30–60℃能保持在最佳酶活力的60%上。对PsOX全细胞催化反应体系进行优化,确定最佳菌体添加量为30 OD_{600}/mL ,

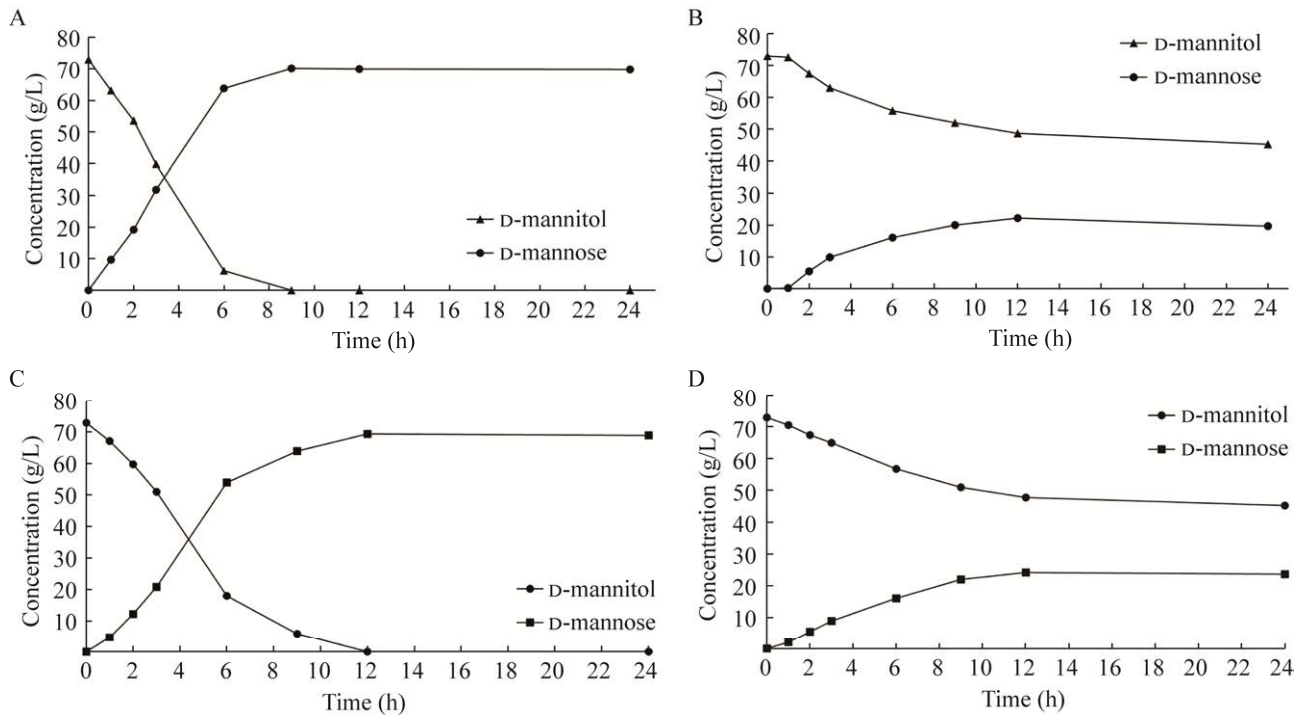


图 7 PsOX、AldO 全细胞催化合成 D-甘露糖的比较 A: PsOX 全细胞催化合成 D-甘露糖摇瓶反应. B: AldO 全细胞催化合成 D-甘露糖摇瓶反应. C: PsOX 全细胞催化合成 D-甘露糖发酵罐反应. D: AldO 全细胞催化合成 D-甘露糖发酵罐反应

Figure 7 Comparison of whole cell catalytic synthesis of D-mannose by PsOX and AldO. Whole cell catalytic synthesis of D-mannose by PsOX (A) and AldO (B) in shake flask; Whole cell catalytic synthesis of mannose by PsOX (C) and AldO (D) in fermentor.

最适甘露醇浓度为 400 mmol/L, 摩尔转化率为 95.2%。

总结了目前报道的具有 D-甘露醇催化活性的氧化酶(表 2), 它们对其他糖醇类化合物, 如山梨醇、木糖醇、苏糖醇和阿糖醇均有催化活性, 但研究主要集中在酶的酶学性质、蛋白结构解析等基础研究, 缺乏其在合成糖类物质中的应用研究。本研究比较了 PsOX 与 AldO 全细胞催化合成 D-甘露糖时的催化效率, 底物为 73 g/L 时, PsOX 对 D-甘露醇的转化率为 95.9%, AldO 不能将底物完全转化, 转化率约 30%。利用发酵罐扩大了催化反应体系, PsOX 对 D-甘露醇的转化率为 95.3%, AldO 仍然无法将 D-甘

露醇完全转化, 转化率为 32.3%。PsOX 相较于 AldO, 在 D-甘露糖的酶法制备中具有更强的工业化应用潜力。

D-甘露糖的制备工艺有很多种^[21], 利用生物法合成 D-甘露糖多以 D-果糖、D-葡萄糖为底物(表 3), 本研究以 D-甘露醇为底物, 利用 PsOX 氧化酶能够将 73 g/L 底物完全转化, 提高了转化率, D-甘露糖的产量约 70 g/L, 生产强度约 6 kg/(m³·h)。考虑到以 D-甘露醇作为底物合成 D-甘露糖在生产中的成本较高, 后续可采用多酶级联反应策略, 首先利用较廉价底物合成 D-甘露醇, 如以蔗糖或果糖为底物, 利用蔗糖水解酶(sucrose hydrolase, EC 3.2.1.26)、甘露醇

表 2 不同来源具有 D-甘露醇催化活性的氧化酶

Table 2 Oxidases with D-mannitol catalytic activity from different organisms

	Enzyme	Organism	Substrate	K_m (mmol/L)	k_{cat} (1/s)	k_{cat}/K_m (L/(s·mmol))
AldO ^[17]	Alditol oxidase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3	D-mannitol	36±2	9.2±0.2	0.26
HotAldO ^[19]	Alditol oxidase	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> 11B	D-mannitol	5.5	2.5	0.45
SOX ^[20]	Sorbitol oxidase	<i>Streptomyces</i> sp. H-7775	D-mannitol	7.38	—	—

—: Means not mentioned.

表 3 生物法合成 D-甘露糖

Table 3 Biological synthesis of D-mannose

Substrate	Enzyme	Organism	Substrate concentrate (g/L)	Condition	Conversion rate (%)
D-fructose	Mannose isomerase ^[11]	<i>Pseudomonas</i> sp.	300	pH 7.0, 50 °C	12
	Mannose isomerase ^[12]	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	100	pH 7.0, 50 °C	25
	D-lyxose isomerase ^[13]	<i>Thermoprotei archaeon</i>	80	pH 6.5, 80 °C	20
	N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase ^[22]	<i>Pseudomonas geniculata</i>	200	pH 7.5, 50 °C	39
D-glucose	Cellobiose 2-epimerase ^[14]	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	500	pH 7.5, 75 °C	15
	D-glucose isomerase, D-lyxose isomerase ^[15]	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> , <i>Thermosediminibacter oceani</i>	400	pH 6.5, 65 °C	15
	D-glucose isomerase, D-lyxose isomerase ^[16]	<i>Acidothermus cellulolyticus</i> , <i>Peptococcaceae bacterium</i>	100	pH 6.0, 70 °C	14
	D-mannitol	Mannitol oxidase	<i>Paenibacillus</i> sp.	73	pH 7.0, 35 °C

脱氢酶(mannitol dehydrogenase, EC 1.1.1.67)催化合成 D-甘露醇^[23-24]。还可利用代谢工程构建 D-甘露醇生产菌株,能直接以无机盐培养基和葡萄糖果糖作为混合碳源,发酵获得 D-甘露醇^[25],再利用 D-甘露醇氧化酶催化 D-甘露醇合成 D-甘露糖。

总之, D-甘露糖在食品、医药、农业领域应用广泛,利用生物催化的方法实现其高效合成是极具价值的研究方向,本研究提出了一种利用 D-甘露醇氧化酶催化 D-甘露醇合成 D-甘露糖的方法,为 D-甘露糖的酶法合成及其“绿色”工业化生产提供了依据。

REFERENCES

- [1] FENG D, SHI B, BI FF, SAGNELLI M, SUN XL, JIAO J, WANG XX, LI D. Elevated serum mannose levels as a marker of polycystic ovary syndrome[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2019, 10: 711.
- [2] 王则奋, 袁熹涛, 彭小玉, 潘丽珠. D-甘露糖的性质、应用及市场前景[J]. *大众科技*, 2019, 21(5): 38-40.
WANG ZF, YUAN XT, PENG XY, PAN LZ. The properties, applications and market prospects of D-mannose[J]. *Popular Science & Technology*, 2019, 21(5): 38-40 (in Chinese).
- [3] MAZUMDER P, MUKHOPADHYAY C. Conformations, dynamics and interactions of di-, tri- and pentamannoside with mannose binding lectin: a molecular dynamics study[J]. *Carbohydrate Research*,

- 2012, 349: 59-72.
- [4] LENGER SM, BRADLEY MS, THOMAS DA, BERTOLET MH, LOWDER JL, SUTCLIFFE S. D-mannose vs. other agents for recurrent urinary tract infection prevention in adult women: a systematic review and meta-analysis[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2020, 223(2): 265.
- [5] TOYOKUNI T, KUMAR J, GUNAWAN P, BASARAH E, LIU J, BARRIO J, SATYAMURTHY N. Practical and reliable synthesis of 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-O-trifluoromethanesulfonyl-beta-D-mannopyranose, a precursor of 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose[J]. Molecular Imaging & Biology, 2004, 6(6): 417.
- [6] SAHA BC, RACINE FM. Biotechnological production of mannitol and its applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 879-891.
- [7] TAKAHASHI H, IWAI Y, HITOMI Y, IKEGAMI S. Novel synthesis of L-ribose from D-mannono-1,4-lactone[J]. Organic Letters, 2002, 4(14): 2401-2403.
- [8] 裴俊, 盛艳花, 高力群. 一种制备高纯度D-甘露糖的方法: CN105087712A[P]. 2015-11-25.
PEI J, SHENG YH, GAO LQ. Method for preparing high-purity D-mannose: CN105087712A[P]. 2015-11-25 (in Chinese).
- [9] 方积年, 王洪诚, 张德忠, 丁浩. 从棕榈籽制备 D-甘露糖[J]. 化学世界, 1981(9): 25-26.
FANG JN, WANG HC, ZHANG DJ, DING H. Preparation of D-mannose from palm tree seeds[J]. Chemical World, 1981(9): 25-26 (in Chinese).
- [10] TAKEMURA M, IJIMA M, TATENO Y, OSADA Y, MARUYAMA H. Process for preparing D-mannitol: US4083881[P]. 1978-04-11.
- [11] TAKASAKI Y, HINOKI K, KATAOKA Y, FUKUYAMA S, NISHIMURA N, HAYASHI S, IMADA K. Enzymatic production of D-mannose from D-fructose by mannose isomerase[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1993, 76(3): 237-239.
- [12] WU YC, HUANG ZL, ZHANG WL, GUANG CE, CHEN QM, MU WM. Characterization of a novel mannose isomerase from *Stenotrophomonas rhizophila* and identification of its possible catalytic residues[J]. Molecular Biotechnology, 2022, 64(6): 650-659.
- [13] WU H, CHEN M, GUANG CE, ZHANG WL, MU WM. Identification of a novel recombinant D-lyxose isomerase from *Thermoprotei archaeon* with high thermostable, weak-acid and nickel ion dependent properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164: 1267-1274.
- [14] PARK CS, KIM JE, CHOI JG, OH DK. Characterization of a recombinant cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and its application in the production of mannose from glucose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(6): 1187-1196.
- [15] HUANG JW, YU LN, ZHANG WL, ZHANG T, GUANG CE, MU WM. Production of D-mannose from D-glucose by co-expression of D-glucose isomerase and D-lyxose isomerase in *Escherichia coli*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018, 98(13): 4895-4902.
- [16] 吴昊, 黄嘉苇, 张文立, 沐万孟. 重组共表达大肠杆菌细胞从 D-葡萄糖一锅法生产 D-甘露糖[J]. 微生物学通报, 2020, 47(7): 2151-2160.
WU H, HUANG JW, ZHANG WL, MU WM. One-pot production of D-mannose from D-glucose by recombinant co-expressing *Escherichia coli* cells[J]. Microbiology China, 2020, 47(7): 2151-2160 (in Chinese).
- [17] HEUTS DPHM, van HELLEMOND EW, JANSSEN DB, FRAAIJE MW. Discovery, characterization, and kinetic analysis of an alditol oxidase from *Streptomyces coelicolor*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(28): 20283-20291.
- [18] FORNERIS F, HEUTS DPHM, DELVECCHIO M, ROVIDA S, FRAAIJE MW, MATTEVI A. Structural analysis of the catalytic mechanism and stereoselectivity in *Streptomyces coelicolor* alditol oxidase[J]. Biochemistry, 2008, 47(3): 978-985.
- [19] WINTER RT, HEUTS DPHM, RIJPKEMA EMA, van BLOOIS E, WIJMA HJ, FRAAIJE MW. Hot or not? Discovery and characterization of a thermostable alditol oxidase from *Acidothermus cellulolyticus* 11B[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(2): 389-403.
- [20] HIRAGA K, KITAZAWA M, KANEKO N, ODA K. Isolation and some properties of sorbitol oxidase from *Streptomyces* sp. H-7775[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997, 61(10): 1699-1704.
- [21] 倪妮妮, 胡超群, 白福来, 季文娜, 张茜. D-甘露糖生产工艺及生理功能研究进展[J]. 食品工业科技,

- 2022, 43(17): 458-465.
- NI WW, HU CQ, BAI FL, JI WN, ZHANG Q. Research progress on the production technology and physiological function of D-mannose[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(17): 458-465 (in Chinese).
- [22] LIU ZZ, LI Y, WU J, CHEN S. A novel *Pseudomonas geniculata* AGE family epimerase/isomerase and its application in D-mannose synthesis[J]. Foods, 2020, 9(12): 1809-1818.
- [23] 陈艳, 田康明, 李玉, 王正祥, 路福平. 以蔗糖为底物利用重组大肠杆菌合成甘露醇[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2182-2189.
- CHEN Y, TIAN KM, LI Y, WANG ZX, LU FP. Mannitol biotransformation from sucrose with recombinant *Escherichia coli*[J]. Microbiology China, 2014, 41(11): 2182-2189 (in Chinese).
- [24] 潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 吕青兰, 朱荣帅, 张显, 饶志明. 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成 D-甘露醇[J]. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2549-2565.
- PAN S, HU MK, PAN XW, LYU QL, ZHU RS, ZHANG X, RAO ZM. Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(7): 2549-2565 (in Chinese).
- [25] 王小芳, 陈晶, 刘萍萍, 徐洪涛, 郁彭, 张学礼. 利用代谢工程构建 D-甘露醇生产菌株[J]. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1450-1462.
- WANG XF, CHEN J, LIU PP, XU HT, YU P, ZHANG XL. Production of D-mannitol by metabolically engineered *Escherichia coli*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(10): 1450-1462 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)