DOI:10.12441/spyswjs.20240301002 [文章编号] 1673-1689(2025)08-0022-09

重组大肠杆菌高效催化合成阿洛醇

曹 颖[1,2] 苗培宇[1] 刘 芸[1] 张子刚[1] 张 显[1] 饶志明[1,2,3*]

(1. 江南大学生物工程学院,江苏 无锡 214122; 2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122; 3. 江苏集萃未来食品技术研究院,江苏 无锡 214200)

摘要:【目的】通过生物催化法提高阿洛醇的转化效率。**【方法】**在大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)BL21中分别表达来自产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)和产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)的核糖醇脱氢酶(RDH)基因*rdh*,分别命名为*Pardh*、*Kprdh*、*Kordh*,以筛选转化率较高的目标基因。进一步将产酸克雷伯菌来源的RDH与博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)来源的甲酸脱氢酶(FDH)进行偶联催化,并对催化条件和辅底物添加量进行优化,实现酶法高效催化合成阿洛醇。**【结果】**利用FDH和产酸克雷伯菌来源的RDH,在初始底物*D*-阿洛酮糖50 g/L、6 h后持续流加底物至总质量浓度为100 g/L,并以甲酸钠为辅底物的条件下,阿洛醇转化率达53.3%。**【结论】**通过RDH与FDH偶联体系催化可以提高阿洛醇转化率。

关键词:阿洛醇;核糖醇脱氢酶;甲酸脱氢酶;全细胞生物催化

Efficient Catalytic Synthesis of Allitol in Recombinant *Escherichia coli*

CAO Ying[1,2] *MIAO Peiyu*[1] *LIU Yun*[1] *ZHANG Zigang*[1] *ZHANG Xian*[1] *RAO Zhiming*[1,2,3*]

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Institute of Future Food Technology, JITRI, Wuxi 214200, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to enhanced the conversion efficiency of allitol through biocatalytic methods. [**Methods**] The ribulose dehydrogenase (RDH) genes *rdh* from *Providencia alcalifaciens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* were respectively expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21, designated as *Pardh*, *Kprdh* and *Kordh* respectively to identify the target genes with higher transformation rates. Further, the RDH from *Klebsiella oxytoca* was coupled with the formate dehydrogenase (FDH) from *Candida boidinii* for co-catalysis, and the catalytic conditions and the addition amounts of co-substrates were optimized to achieve efficient enzymatic catalytic synthesis of allitol. [**Results**] When using FDH and RDH from *Klebsiella pneumoniae* with an initial substrate *D*-piscose of 50 g/L and continuous feeding over 6 h to a total concentration of 100 g/L, in the presence of sodium formate as the auxiliary substrate, the conversion rate of allitol reached 53.3%. [**Conclusion**] By coupling the RDH and FDH systems, the conversion rate of allitol can be increased.

Keywords: allitol; ribulose dehydrogenase; formate dehydrogenase; whole-cell biocatalysis

阿洛醇是一种六碳稀有糖醇,在自然界内含量较低,但具有重要的生理功能,可在食品工业中用作甜味剂和填充剂,也可应用于医药化工领域[1]。阿洛醇难以从自然资源中获取,从天然物

基金项目:国家“十四五”重点研发计划项目(2021YFC2100900)。

通信作者:饶志明(1975—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事微生物代谢工程与合成生物学研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

收稿日期:2024-03-01 **修回日期:**2024-04-07

质中提取不仅资源消耗大、污染环境，而且成本较高，不适合大规模生产[2]。化学合成法虽然合成速率较快，但存在底物受限，且会生成副产物，增加了分离纯化的难度[3]。相比之下，生物合成法具有反应条件温和、无副产物、对环境污染小、成本低、产率高等优点[4]。*D*-阿洛酮糖到阿洛醇的生物合成途径见图1。

生物法合成阿洛醇包括酶催化法和全细胞生物催化法。通过生物法由*D*-阿洛酮糖或*D*-果糖、葡萄糖合成阿洛醇主要涉及3种酶：1）*D*-阿洛酮糖-3-差向异构酶[5]，可将果糖催化为*D*-阿洛酮糖；2）RDH，能实现*D*-阿洛酮糖向阿洛醇的转化，其催化活性受NADH影响[6]；3）FDH，可作为RDH催化反应的辅酶，提供反应所需的NADH[7]。Takeshita等[8]利用酶促反应实现了由*D*-阿洛酮糖向阿洛醇的生物转化，随后在反应体系中加入DTE酶，将果糖转化为阿洛醇。尽管酶催化法已实现较高的转化效率，但反应体系需要额外添加辅酶NADH，且酶的提取及分离纯化过程也会影响其大规模生产[9]。

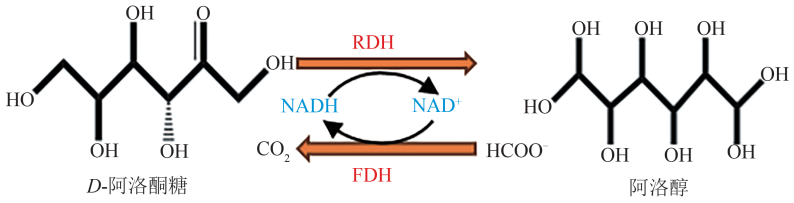


图1　*D*-阿洛酮糖到阿洛醇的生物合成途径

Fig. 1　Biotransformation pathway of *D*-piscose to allitol

目前阿洛醇主要是通过微生物全细胞生物催化法，以*D*-阿洛酮糖或果糖为底物合成阿洛醇[10]。以往的研究主要集中于关键酶的模块化表征以及基本细胞工厂的构建。如Han等[11]利用产酸克雷伯菌实现了由*D*-阿洛酮糖合成阿洛醇，在底物质量分数25%、温度37 ℃、pH 8.0的条件下反应36 h，阿洛醇转化率达87%。与此同时，研究人员开始探索以果糖为底物合成阿洛醇的可行性。Zhu等[12]在工程大肠杆菌中构建了含*D*-阿洛酮糖-3-差向异构酶、RDH、FDH的体内多酶级联催化系统，以*D*-阿洛酮糖为底物催化合成阿洛醇，在底物浓度为0.5 mol/L的条件下，最终获得48.26 g/L的阿洛醇。然而，在阿洛醇全细胞合成的研究中，普遍存在中间体积累、全细胞生物催化性能较低的问题；且关于阿洛醇合成限速步骤的研究也较少，因此仍需进一步研究[13]。

在阿洛醇的生物转化过程中，由*D*-阿洛酮糖到阿洛醇的转化需消耗大量的NADH，因此胞内NADH含量是NADH依赖型氧化还原反应的关键限制因素[14]。有研究报道，提高NADH供给可在很大程度上改变产物合成的代谢流向并提高产率，但NADH供给过量也会导致目标产物的产率降低。因此，通过调节辅因子含量以提高合成效率仍然是一个具有挑战性的研究方向[15]。该研究旨在通过全细胞生物催化法，以*D*-阿洛酮糖为底物生产阿洛醇，并通过优化辅底物、辅酶因子供给等条件改进生产工艺，以获得较高的阿洛醇转化率。作者首先分别构建了3种不同RDH来源的重组大肠杆菌，通过全细胞生物催化合成阿洛醇以确定高效转化的RDH基因*rdh*；随后通过优化RDH与FDH的酶活力比及辅底物添加量，以实现*D*-阿洛酮糖向阿洛醇的高效转化。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

E. coli JM109、*E. coli* BL21以及pET-28a、pACYC-Duet-1、pETDuet-1质粒由作者所在实验室保存。通过NCBI获得产碱普罗威登斯菌、肺炎克雷伯菌和产酸克雷伯菌来源的RDH基因*Pardh*（GenBank登录号：NZ_JALB01000025）、*Kprdh*（GenBank登录号：CAHPRC010000011）和*Kordh*（GenBank登录号：LR133932），以及博伊丁假丝酵母来源的FDH基因*Cbfdh*（GenBank登录号：7657866）的序列。基因序列经密码子优化后，由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

限制性内切酶：宝日生物科技有限公司；葡萄糖、果糖、*D*-阿洛酮糖、阿洛醇、NADH、NAD^+：麦克林生化科技股份有限公司；抗生素、IPTG：生工生物工程（上海）有限公司；DNA 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒：南京诺唯赞生物医药科技有限公司；其他化学试剂、培养基：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养条件与方法

LB 培养基：酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、蛋白胨 10 g/L，调 pH 至 7.0，用于大肠杆菌的培养。抗生素质量浓度为：氨苄青霉素 100 μg/mL、卡那霉素 50 μg/mL。

种子培养条件：从活化平板上挑取单菌落接种至 10 mL LB 液体培养基中，添加终浓度为 0.1 mmol/L 的氨苄青霉素，于 37 ℃、200 r/min 条件下振荡培养 10 h。

摇瓶培养与诱导条件：以体积分数 1% 的接种量转接至 50 mL 的 LB 培养基中，添加终浓度为 0.1 mmol/L 的氨苄青霉素，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养至 OD_{600} 值为 0.8 时，添加终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG，于 20 ℃诱导 12~14 h。

1.2.2 重组大肠杆菌的构建

以博伊丁假丝酵母的全基因组为模板，使用特异性引物 *Cbfdh*-F、*Cbfdh*-R 进行 PCR 扩增，获得 FDH 基因片段 *Cbfdh*。将该基因与经限制性内切酶（*Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ）双酶切的质粒 pET28a 通过同源重组酶连接转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中，构建得到 *E. coli* BL21/pET28a-*Cbfdh* 菌株。*Pardh*、*Kprdh* 和 *Kordh* 基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成。分别以 pET28a-*Kprdh*-F/R、pET28a-*Kordh*-F/R 和 pET28a-*Pardh*-F/R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 产物纯化后得到的 *Kprdh*、*Kordh* 和 *Pardh* 基因片段，分别与经 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ双酶切线性化的 pET28a 质粒进行同源重组连接，连接产物分别转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中。37 ℃摇床培养 2 h 后，涂布于含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上，于 37 ℃培养箱倒置培养 8~12 h。挑取转化子进行菌落 PCR 验证，对验证正确的转化子进行培养并提取重组质粒，由苏州金唯智生物科技有限公司测序分析。测序正确的重组菌株分别命名为 *E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*。该研究使用的引物序列见表 1。

表 1 本研究中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列（5′—3′）	片段大小/bp
pET28a-*Kprdh*-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAACCACTCTGTCTCCTCTATGAATACT	55
pET28a-*Kprdh*-R	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGAGATCCACGCTGTTCGG	42
pET28a-*Kordh*-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGAACCACTCTGTCTCCTCTATGAATACT	55
pET28a-*Kordh*-R	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTCAGAGATCCACGCTGTTCGG	42
pET28a-*Pardh*-F	GCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCATGGCTATCTCATTAGAAAACAAAGTTGCC	55
pET28a-*Pardh*-R	CTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGAGGTCAACGCTGTTAGGAAGAATG	51
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
T7term	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	20
Cbfdh-F	ACAGCCAGGATCCGAATTCAATGAAGATCGTGTTAGTCCTTTACGACG	51
Cbfdh-R	GCGGCCGCAAGCTTGTCGACTTATTATTTTTTATCGTGTTTCCCGTAGGCCT	51

1.2.3 RDH 的表达与纯化

RDH 的表达纯化参照文献[16]的方法。将重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh* 在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板上活化，挑取单菌落转接至 10 mL 含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中，于 37 ℃、200 r/min 培养 8~12 h。然后以体积分数 2% 的接种量转接至 50 mL LB 液体培养基中，于 37 ℃、200 r/min 条件下培养 2 h，添加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG，于 20 ℃、200 r/min 条件下培养 18 h，诱导 RDH 表达。对照菌株 *E. coli* BL21/pET28a 空载体按相同方法进行诱导表达。于 4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min，弃去培养基，用 5 mL Tris-HCl 缓冲液（50 mmol/L，pH 7.0）

洗涤菌体2次，再用相同浓度的缓冲液重悬菌体。采用超声破碎仪对重悬菌体进行破碎（破碎功率50%，工作1 s停歇3 s），于4 ℃、10 000 r/min离心20 min，收集上清液用于SDS-PAGE分析和RDH纯化。粗酶液上清液经0.2 μm滤膜过滤后，经Ni-NTA亲和柱纯化，收集纯化后的RDH，测定RDH酶活力[16]。

1.2.4　酶活力测定

通过检测340 nm下1 min内消耗NADH或产生NAD^+引起的吸光度变化，计算RDH酶活力。以25 g/L *D*-阿洛酮糖作为催化底物，加入200 μL RDH粗酶液及0.4 mmol的NADH，用Tris-HCl缓冲液（50 mmol/L，pH 7.0）补足至1 mL，于40 ℃催化反应20 min后，立即沸水浴10 min终止反应。RDH酶活力单位定义为：每分钟消耗1 μmol NADH所需要的酶量为一个酶活力单位（U/mL）。

蛋白质质量浓度通过牛血清蛋白质法测定。比活指每毫克蛋白质所具备的酶活力单位数[17]。

1.2.5　全细胞生物催化条件优化

按1.2.3的方法对菌株进行诱导表达。于4 ℃、10 000 r/min条件下离心5 min，弃去培养基，用Tris-HCI缓冲液（50 mmol/L、pH 7.0）洗涤菌体2次，获得全细胞生物催化剂。为优化全细胞生物催化合成阿洛醇的条件，将离心收集的RDH过表达菌株用Tris-HCI缓冲液（50 mmol/L、pH 7.0）洗涤2次，并用相同浓度的缓冲液重悬菌体。转化体系为20 mL，添加40 g/L *D*-阿洛酮糖和0.4 mol/L NADH，用50 mmol/L、pH为7.0的Tris-HCl作为转化液，将5 mL全细胞生物催化剂（重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*，OD_{600}值约为30）分别加入反应体系中开启反应。为研究全细胞生物催化的最佳温度，反应体系在不同温度（25、30、35、40、45、50 ℃）下反应12 h，取样测试阿洛醇产量。对于pH的优化，调节反应体系初始pH为6.0~10.0（间隔1.0）。为了确定生物催化剂的最佳菌体浓度，分别使用OD_{600}值为20~60（间隔10）的重组菌株悬浮液作为生物催化剂，催化合成阿洛醇。最后，研究底物*D*-阿洛酮糖质量浓度（30、40、50、60 g/L）对全细胞生物催化合成阿洛醇的影响，以确定最优底物质量浓度。

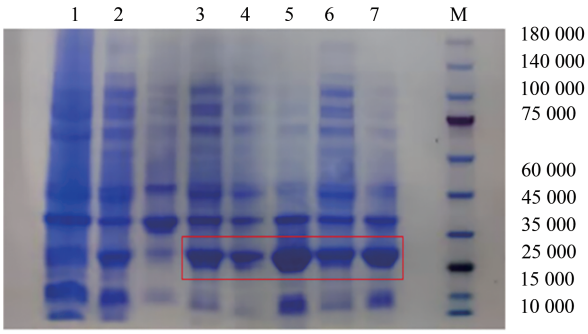
1.2.6　高效液相色谱（HPLC）检测条件

底物*D*-阿洛酮糖及产物阿洛醇质量浓度均通过HPLC测定。采用安捷伦1260 HPLC，配备RID检测器进行分析。检测条件为：Hi-Plex Ca色谱柱（300 mm×7.7 mm×8 μm），柱温80 ℃，检测温度35 ℃，流动相为超纯水，流量0.6 mL/min，单个样品运行时间30 min。

2　结果与讨论

2.1　RDH的表达及酶活力测定结果

按1.2.3所述方法对3种不同来源的RDH进行诱导表达，SDS-PAGE结果见图2。结果表明，*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*的上清液分别约在27 500、27 500、26 700出现条带变粗现象，即*Kprdh*、*Kordh*和*Pardh*基因在*E. coli* BL21异源表达成功。



1—*E. coli* BL21/pET28a对照菌株细胞破碎液；
2—*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*重组菌株细胞破碎液上清液；
3—*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*重组菌株细胞破碎液沉淀；
4—*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*重组菌株细胞破碎液上清液；
5—*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*重组菌株细胞破碎液沉淀；
6—*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*重组菌株细胞破碎液上清液；
7—*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*重组菌株细胞破碎液沉淀；
M—蛋白质Marker。

图2　不同来源RDH的SDS-PAGE结果

Fig. 2　SDS-PAGE results of RDH enzymes from different sources

蛋白质质量浓度标准曲线见图3。根据蛋白质质量浓度标准曲线计算可得，*Kp*RDH、*Ko*RDH和*Pa*RDH质量浓度分别为189.89、206.28、198.77 μg/mL；进一步检测并计算纯化后的酶的比活，结果显示*Kp*RDH、*Ko*RDH和*Pa*RDH的比活分别为8.2、9.1、8.8 U/mg。综上，选择*Ko*RDH作为后续研究对象。

2.2　全细胞生物催化条件确定

在合成生物学领域，全细胞生物催化法用于合成目标产物已较为普及，该方法具有副反应少、

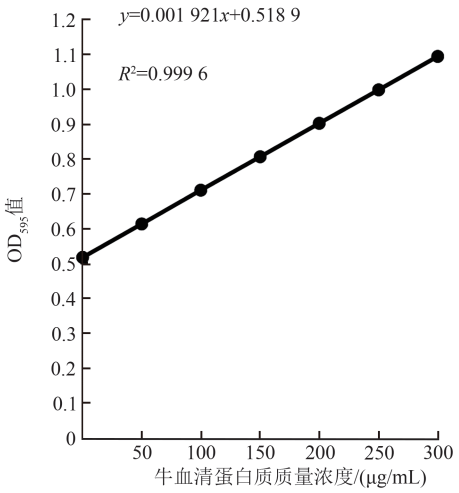


图 3　蛋白质质量浓度标准曲线

Fig. 3　Standard curve of protein mass concentration

产物易分离、环境影响小的优点。在全细胞生物催化生成目标产物的过程中，关键酶的酶活力及反应效率常受反应条件的影响，这些反应条件主要包括反应温度、pH、底物浓度及菌体生物量等。因此，为充分发挥 RDH 的催化能力，在全细胞生物催化体系中尽可能提高阿洛醇产量，该研究针对全细胞生物催化合成阿洛醇的温度、pH、菌体生物量及底物质量浓度进行了优化。

2.2.1　温度的确定

为确定最佳反应温度，在不同温度下测定全细胞的转化能力，结果见图 4。当反应温度为 25~50 ℃时，阿洛醇产量随温度升高呈先升高后降低的趋势。其中，重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh* 和 *E. coli* BL21/pET28a-*Pardh* 在 35 ℃时催化生成阿洛醇的产量最高，分别为 17.8、18.3 g/L；

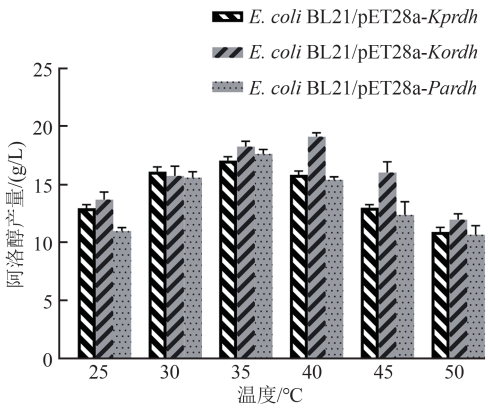


图 4　温度对阿洛醇产量的影响

Fig. 4　Effect of temperature on yield of allitol

而重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*Kordh* 在 40 ℃时的阿洛醇产量最高，为 19.4 g/L。

2.2.2　pH 的确定

pH 通过影响蛋白质的空间构型、稳定性及底物的解离状态，进而影响多酶级联反应的催化效率。不同酶具有各自的最适 pH，只有在最适 pH 下，酶才能发挥最佳的催化效果。采用 4 种浓度均为 50 mmol/L 的缓冲液（pH 4.0~6.0 的醋酸钠缓冲液、pH 6.0~8.0 的磷酸钠缓冲液、pH 8.0~9.0 的 Tris-HCl 缓冲液和 pH 9.0~11.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液）进行 pH 优化试验，结果见图 5。*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh* 分别在 pH 为 8.0、7.0、9.0 时阿洛醇产量最高，分别为 19.2、20.5、19.6 g/L。因此，后续反应分别在各自最适 pH 条件下转化。

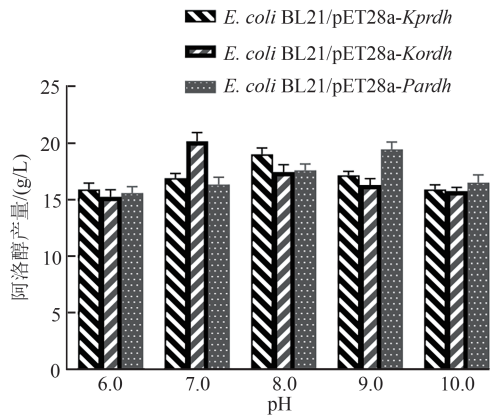


图 5　pH 对阿洛醇产量的影响

Fig. 5　Effect of pH on yield of allitol

2.2.3　菌体生物量的确定

在工业生产中，菌体生物量对整个转化体系具有重要影响。若能在低生物量下达到最佳生产效率，无疑可降低生产成本。菌体生物量对阿洛醇产量的影响见图 6。在 OD_{600} 值为 20~60 时，重组菌株 *E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh* 的阿洛醇产量均随 OD_{600} 值的增加呈先增加后减小的趋势，且均在 OD_{600} 值为 30 时最高，分别为 20.4、21.7、20.2 g/L。当 OD_{600} 值超过 30 时，阿洛醇产量逐渐下降，这可能是由于菌体生物量过高导致转化体系黏稠度增加，影响物质在菌体与反应液间的传递。因此，后续反应均在 OD_{600} 值为 30 的条件下进行。

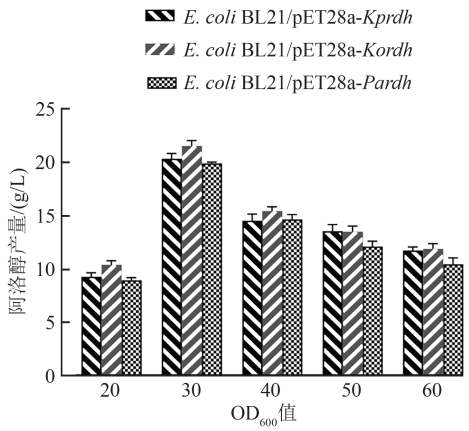


图6　菌体生物量对阿洛醇产量的影响

Fig. 6　Effect of biomass of microorganisms on yield of allitol

2.2.4　底物质量浓度的优化

底物质量浓度是优化全细胞生物催化效率需重点调整的关键参数，因此确定转化体系的最适底物质量浓度具有重要意义。底物质量浓度对阿洛醇产量的影响见图7。重组菌株*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*的阿洛醇的产量均在底物质量浓度为50 g/L时最高；当底物质量浓度继续升高时，反应体系中阿洛醇产量虽有增加，但转化率却开始下降。结果表明，较高的底物质量浓度并非一定有利于提高转化率。因此，后续反应均在*D*-阿洛酮糖质量浓度为50 g/L的条件下进行。

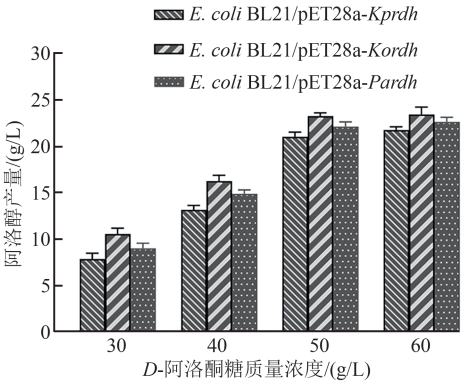


图7　底物质量浓度对阿洛醇产量的影响

Fig. 7　Effect of substrate mass concentrations on yield of allitol

2.2.5　最优菌株在最适条件下催化合成阿洛醇

在上述研究中，已确定重组菌株*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*的最适温度、pH、菌体生物量和底物质量浓度。因此，将重组菌株*E. coli* BL21/pET28a-*Kprdh*在温度35 ℃、pH 8.0、OD_{600}值30，重组菌株*E. coli* BL21/pET28a-*Kordh*在温度40 ℃、pH 7.0、OD_{600}值30，重组菌株*E. coli* BL21/pET28a-*Pardh*在温度35 ℃、pH 9.0、OD_{600}值30，底物*D*-阿洛酮糖质量浓度均为50 g/L的条件下进行全细胞转化，结果见图8。3株重组菌株的阿洛醇产量最高分别为23.4、26.5、24.6 g/L。因此，来源于产酸克雷伯菌的*Kordh*基因为最优表达基因，后续研究均以该基因为研究对象。

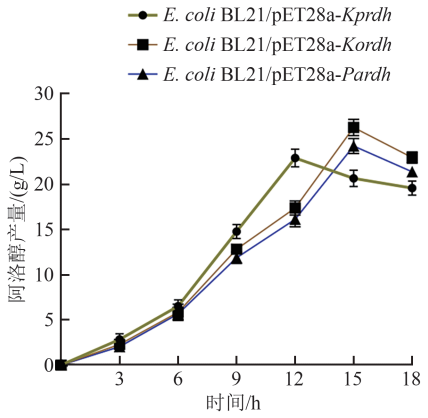


图8　3种重组菌株在最适条件下的阿洛醇产量

Fig. 8　Yield of allitol under optimal conditions of three recombinant strains of bacteria

2.3　构建辅酶循环系统高效合成阿洛醇

2.3.1　RDH与FDH酶活力比的确定

在确定*Kordh*基因为最适表达的RDH基因的基础上，采用辅酶循环策略，向体系中加入0.2 mol/L NADH，发现NADH的添加量对转化反应存在限制作用。为降低反应过程中NADH的用量，利用作者所在实验室已构建的FDH过表达菌株*E.coli* BL21/pET28a-*Cbfdh*[18]，设计了RDH与FDH的级联反应体系，其中FDH可作为辅酶参与反应催化NADH再生，为全细胞生物催化系统提供辅因子。当构建酶介导的级联反应时，各酶的酶活力比是影响产物产量的关键因素。因此，为提高阿洛醇的纯度与产量，在反应体系中加入15 g/L的甲酸钠，通过研究体系中RDH与FDH的酶活力比，旨在增强2种酶的协同作用，见图9。结果表明，阿洛醇产量随RDH与FDH的酶活力比的增加呈先升高后降低的趋势，当催化体系中RDH与

FDH的酶活力比为3∶1时，阿洛醇产量最高；继续提高酶活力比后，催化系统生成的阿洛醇产量趋于稳定。表明RDH与FDH酶活力比为3∶1是该催化系统中生产阿洛醇的最适酶活力比。另外，此条件下的阿洛醇产量略低于辅酶充足时的产量，这是由于辅酶循环策略虽已成功，但该策略下的转化率仍低于直接添加充足NADH的反应体系。

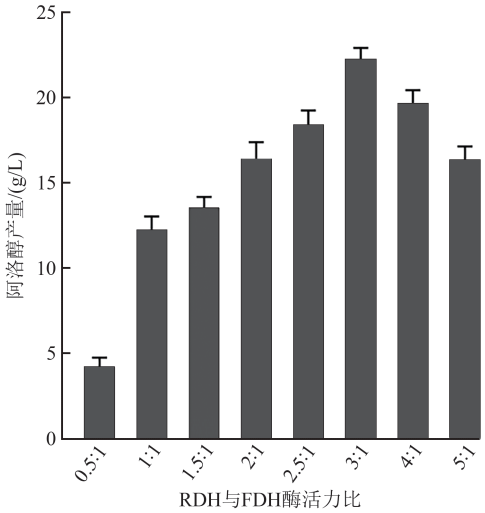


图9　RDH与FDH的酶活力比对阿洛醇产量的影响

Fig. 9　Effect of RDH and FDH ratios on yield of allitol

2.3.2　辅底物添加量的确定

甲酸钠可作为全细胞生物催化系统的辅底物参与反应，在FDH的催化下可将其转化为CO_2，同时生成NADH。因此，在反应体系中添加甲酸钠能够促进NADH的再生，进而影响全细胞生物催化效率。基于此，作者探究了甲酸钠添加量对全细胞生物催化效率的影响。对比分析*D*-阿洛酮糖与甲酸钠浓度比分别为50∶0、50∶1、10∶1、5∶1、5∶2、5∶4、5∶8、1∶2、1∶3、1∶4这10个条件下的相对催化活性，见图10。结果表明，*D*-阿洛酮糖与甲酸钠的最佳浓度比为1∶2。

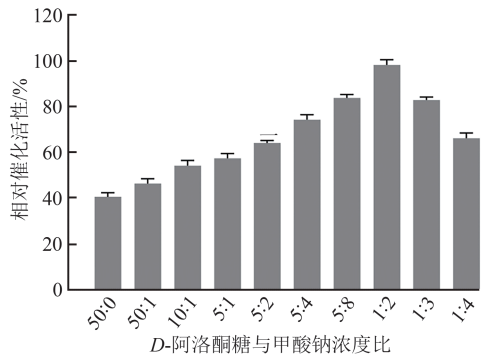


图10　*D*-阿洛酮糖与甲酸钠浓度比对相对催化活性的影响

Fig. 10　Effect of ratios of *D*-piscose to sodium formate on relative catalytic activity

2.3.3　双酶偶联体系在5 L发酵罐催化合成阿洛醇结果

在5 L发酵罐中分别对*E.coli* BL21/pET28a-*Kordh*、*E. coli* BL21/pET28a-*Cbfdh*重组菌株进行培养与诱导。离心收集菌体后用Tris-HCl缓冲液（50 mmol/L，pH 7.0）重悬菌体，并在*Kordh*最优转化条件（温度40 ℃、底物浓度50 g/L、OD_{600}值30、*D*-阿洛酮糖与甲酸钠浓度比1∶2、初始反应体系为2.5 L）下进行混合催化，反应6 h后，流加底物至总质量浓度为100 g/L，结果见图11。0~15 h，催化体系中阿洛醇产量呈明显上升趋势；15~18 h，体系中阿洛醇的产量达到峰值并趋于稳定。至催化反应终点时，体系中阿洛醇产量为53.3 g/L，转化率达53.3%。结果表明，该研究构建的多酶级联体系可正常催化*D*-阿洛酮糖合成阿洛醇。然而，在反应过程中仍存在催化活性低、反应前期中间产物积累过多、催化终点仍有未转化的底物*D*-阿洛酮糖等问题。因此，后续需进一步优化表达体系，以提高体系的催化效率并解决这些问题。

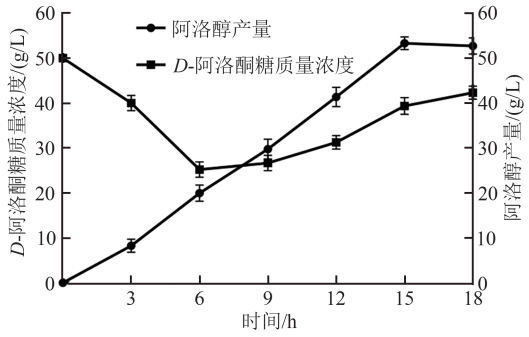


图11　5 L发酵罐全细胞生物催化结果

Fig. 11　Whole-cell biocatalytic results of 5 L fermenter

2.4　讨论

随着稀有糖醇的市场需求量逐年增加，开发高效合成阿洛醇的策略已成为相关领域的研究热点。目前研究人员已经以*D*-阿洛酮糖、*D*-果糖、葡萄糖为底物，通过不同来源的RDH催化，开发出多种阿洛醇合成策略，见表2。研究发现，通过全细胞生物催化合成阿洛醇相较于酶转化法具有一定的成本与工艺优势；但全细胞生物催化体系中的催化剂活性、催化条件及辅酶循环系统仍存在

一定的优化空间，且不同来源的RDH所需催化条件与酶活性上也存在差异，因此阿洛醇的合成领域仍具备较大的研究潜力。该研究通过构建携带不同来源RDH的重组大肠杆菌，经全细胞生物催化条件优化，筛选出催化性能最优的重组菌株，然后通过构建辅酶循环系统最终实现了阿洛醇的高效催化合成。

表2　全细胞生物催化合成阿洛醇的研究现状

Table 2　Progress in whole-cell biocatalyzed synthesis of alloxano

RDH基因来源	底物	质量浓度/（g/L）	产率/%	参考文献
Klebsiella oxytoca G4A4	*D*-阿洛酮糖	10	87	[11]
Klebsiella oxytoca	果糖	90	54.02	[12]
	葡萄糖	50	25.4	[10]
	果糖	100	63	[14]
Providencia alcalifaciens	葡萄糖	25	84.48	[2]
	葡萄糖	25	81.1	[19]

3　结论

为实现阿洛醇的高效催化合成，作者构建了2种用于*D*-阿洛酮糖合成阿洛醇的重组菌株，分别为单一表达RDH的菌株与单一表达FDH的菌株。通过酶学性质研究，确定3种RDH的最优反应条件；进一步通过全细胞生物催化体系优化，明确来自产酸克雷伯菌的RDH为催化性能最优的酶。随后，通过共表达*Cbfdh*优化NADH供给，使全细胞生物催化效率显著提升，为阿洛醇的合成研究提供了参考。在最优条件下，利用重组菌株催化合成阿洛醇产率达53.3%。在试验过程中发现，受RDH酶活力以及稳定性的影响，阿洛醇产量无法持续稳定提升，因此对RDH进行酶活力提升与稳定性改造具有重要意义。目前关于阿洛醇合成的研究仍局限于基本底盘细胞构建及催化体系优化[20]，对合成过程中限速步骤的探究相对较少[21]；而针对阿洛醇合成所需的RDH的定向改造及适应性进化研究也鲜有报道，这一方向或可成为该领域取得突破性进展的重要探索点[22]。此外，应用细胞内支架系统（蛋白质、DNA和RNA支架[23]），可实现酶分子的共区域化[24]，后续可尝试通过提高蛋白质流动性、增加代谢物浓度的方式，进一步促进产物合成[25]。

参考文献

[1] HASSANIN H A M，MU W M，KOKO M Y F，et al. Allitol：production，properties and applications [J]. International Journal of Food Science & Technology，2017，52(1)：91-97.

[2] 赵婧邑，郭燕，冯婷婷，等. 多酶级联系统制备蒜糖醇的细胞工厂构建及工艺优化[J]. 食品科学技术学报，2022，40(3)：88-97.
ZHAO J Y，GUO Y，FENG T T，et al. Construction and process optimization of cell factory for allitol synthesis with multienzymatic cascade system[J]. Journal of Food Science and Technology，2022，40(3)：88-97.(in Chinese)

[3] 温鑫，宁宇航，林慧彬，等. 生物转化生产稀有糖醇：阿洛醇（蒜糖醇）研究进展[J]. 食品与发酵工业，2022，48(1)：286-291.
WEN X，NING Y H，LIN H B，et al. Research progress for biotransformation of allitol[J]. Food and Fermentation Industries，2022，48(1)：286-291.(in Chinese)

[4] 郑蝶，杨海泉，夏媛媛，等. 重组大肠杆菌全细胞催化法生产*N*-乙酰神经氨酸[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(2)：38-46.
ZHENG D，YANG H Q，XIA Y Y，et al. Production of *N*-acetylneuraminic acid from fermentation broth using recombinant *Escherichia coli* whole cells biotransformation [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2024，43(2)：38-46.(in Chinese)

[5] 温鑫. 生物转化法生产稀有糖/醇*D*-阿洛酮糖和阿洛醇[D]. 济南：山东大学，2021.

[6] JUMDE V R，EISINK N N H M，WITTE M D，et al. C3 epimerization of glucose，*via* regioselective oxidation and reduction[J]. the Journal of Organic Chemistry，2016，81(22)：11439-11443.

[7] HASSANIN H A M. 新型核糖醇脱氢酶的克隆表达、性质及其合成阿洛糖醇的应用研究[D]. 无锡：江南大学，2017.

[8] TAKESHITA K，ISHIDA Y，TAKADA G，et al. Direct production of allitol from *D*-fructose by a coupling reaction using *D*-tagatose 3-epimerase，ribitol dehydrogenase and formate dehydrogenase [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering，2000，90(5)：545-548.

[9] TISHKOV V I，POPOV V O. Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase [J]. Biochemistry (Moscow)，2004，69(11)：1252-1267.

[10] WEN X，LIN H B，REN Y L，et al. Optimization for allitol production from *D*-glucose by using immobilized glucose isomerase and recombinant *E. coli* expressing *D*-psicose-3-epimerase，ribitol dehydrogenase and formate dehydrogenase [J]. Biotechnology Letters，2020，42

（11）：2135-2145.

[11] HAN W J，ZHU Y M，MEN Y，et al. Production of allitol from *D*-psicose by a novel isolated strain of *Klebsiella oxytoca* G4A4[J]. Journal of Basic Microbiology，2014，54（10）：1073-1079.

[12] ZHU Y M，LI H Y，LIU P P，et al. Construction of allitol synthesis pathway by multi-enzyme coexpression in *Escherichia coli* and its application in allitol production [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology，2015，42（5）：661-669.

[13] WEN X，LIN H B，REN Y L，et al. Allitol bioproduction by recombinant *Escherichia coli* with NADH regeneration system co-expressing ribitol dehydrogenase（RDH）and formate dehydrogenase（FDH）in individual or in fusion [J]. Electronic Journal of Biotechnology，2022，55：91-98.

[14] WEN X，LIN H B，REN Y L，et al. Efficient allitol bioproduction from *D*-fructose catalyzed by recombinant *E. coli* whole cells，and the condition optimization，product purification[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology，2020，192（2）：680-697.

[15] AALBERS F S，FRAAIJE M W. Enzyme fusions in biocatalysis：coupling reactions by pairing enzymes[J]. ChemBioChem，2019，20（1）：20-28.

[16] Hero Nmeri Godspower，乔郅钠，徐美娟，等. 不同来源 *S*-腺苷甲硫氨酸合酶在大肠杆菌中的表达及催化应用[J]. 食品与发酵工业，2023，49（2）：26-33.
GODSPOWER H N，QIAO Z N，XU M J，et al. Expression and catalytic application of *S*-adenosylmethionine synthase from different sources in *Escherichia coli*[J]. Food and Fermentation Industries，2023，49（2）：26-33.（in Chinese）

[17] 潘珊，胡孟凯，潘学玮，等. 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 M K，PAN X W，et al. 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）

[18] 倪晗朦，胡孟凯，张恒维，等. 半理性设计提高甲酸脱氢酶（*Cb*FDH）活力及热稳定性[J]. 食品与生物技术学报，2023，42（10）：1-8.
NI H M，HU M K，ZHANG H W，et al. Enhanced activity and thermal stability of formate dehydrogenase（*Cb*FDH）*via* semi-rational design [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42（10）：1-8.（in Chinese）

[19] ZHAO J Y，GUO Y，LI Q F，et al. Reconstruction of a cofactor self-sufficient whole-cell biocatalyst system for efficient biosynthesis of allitol from *D*-glucose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2022，70（12）：3775-3784.

[20] HÖLSCH K，WEUSTER-BOTZ D. Enantioselective reduction of prochiral ketones by engineered bifunctional fusion proteins [J]. Biotechnology and Applied Biochemistry，2010，56（4）：131-140.

[21] MOURELLE-INSUA Á，AALBERS F S，LAVANDERA I，et al. What to sacrifice? Fusions of cofactor regenerating enzymes with Baeyer-Villiger monooxygenases and alcohol dehydrogenases for self-sufficient redox biocatalysis[J]. Tetrahedron，2019，75（13）：1832-1839.

[22] 林建强，柴玉颖，温鑫，等. 一种利用重组胞内 RNA 支架固定重组酶促进细胞催化阿洛醇生产的方法：CN111378612A[P]. 2020-07-07.

[23] KI M R，PACK S P. Fusion tags to enhance heterologous protein expression [J]. Applied Microbiology and Biotechnology，2020，104（6）：2411-2425.

[24] 李英，刘伟，朱丽英，等. 丝状自组装蛋白支架介导的双酶级联催化体系构建促进 *D*-塔格糖合成[J]. 现代食品科技，2023，39（11）：48-57.
LI Y，LIU W，ZHU L Y，et al. Construction of a filamentous self-assembling protein scaffold-mediated dual-enzyme catalytic cascade system for enhanced *D*-tagatose synthesis [J]. Modern Food Science and Technology，2023，39（11）：48-57.（in Chinese）

[25] POMETUN A A，BOYKO K M，YURCHENKO T S，et al. Highly-active recombinant formate dehydrogenase from pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus*：Preparation preparation and crystallization [J]. Biochemistry（Moscow），2020，85（6）：689-696.

（责任编辑：刘冬梅）