

## 基于双酶级联协调表达策略高效催化合成 D-甘露醇

潘珊, 胡孟凯, 潘学玮, 吕青兰, 朱荣帅, 张显, 饶志明

江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122

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. 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. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2549-2565.

**摘 要:** D-甘露醇 (D-mannitol) 作为合成抗肿瘤药和免疫刺激剂的重要前体被广泛应用于制药和医疗等行业, 酶法合成 D-甘露醇反应成本昂贵无法满足工业化生产。本研究首先筛选关键酶获得较优性能的甘露醇脱氢酶 *LpMDH* 和用于辅因子 NADH 再生的葡萄糖脱氢酶 *BaGDH*, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3) 中共表达, 实现了基于双酶级联反应催化底物 D-果糖合成 D-甘露醇, D-甘露醇的初步摩尔转化率为 59.7%。针对双酶级联催化反应中辅酶再生用酶与催化用酶表达量不协调的问题, 通过增加 *Bagdh* 拷贝量来提高辅因子循环能力, 获得了双酶催化速率平衡的重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*。进一步对重组菌的全细胞转化条件进行优化, 确定了最适转化条件为反应温度 30 °C, 初始 pH 值 6.5, 菌体量  $OD_{600}=30$ , 底物 D-果糖 100.0 g/L, 辅底物葡萄糖与底物 1:1 摩尔当量。于最优转化条件下 5 L 发酵罐转化 24 h, D-甘露醇的最高产量为 81.9 g/L, 摩尔转化率为 81.9%。本研究提供了一种绿色、高效生物催化生产 D-甘露醇的方法, 为实现其规模化生产奠定了基础, 同时也对其他相关稀有糖醇的研究具有指导意义。

**关键词:** D-甘露醇; D-甘露醇脱氢酶; 双酶协调表达系统; NADH 循环; 全细胞转化

**Received:** January 22, 2022; **Accepted:** April 11, 2022; **Published online:** April 15, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (32171471, 32071470); China Postdoctoral Science Foundation (2021M691280); Jiangsu Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (2021K296B); the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions; Top-Notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions

**Corresponding authors:** RAO Zhiming. Tel/Fax: +86-510-85916881; E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn  
ZHANG Xian. Tel/Fax: +86-510-85916881; E-mail: zx@jiangnan.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金 (32171471, 32071470); 中国博士后科学基金 (2021M691280); 江苏省博士后科研资助计划 (2021K296B); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏高校品牌专业建设工程资助项目

## Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade

PAN Shan, HU Mengkai, PAN Xuewei, LYU Qinglan, ZHU Rongshuai, ZHANG Xian, RAO Zhiming

School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract:** D-mannitol is widely used in the pharmaceutical and medical industries as an important precursor of antitumor drugs and immune stimulants. However, the cost of the current enzymatic process for D-mannitol synthesis is high, thus not suitable for commercialization. To address this issue, an efficient mannitol dehydrogenase *LpGDH* used for the conversion and a glucose dehydrogenase *BaGDH* used for NADH regeneration were screened, respectively. These two enzymes were co-expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) to construct a two-enzyme cascade catalytic reaction for the efficient synthesis of D-mannitol, with a conversion rate of 59.7% from D-fructose achieved. The regeneration of cofactor NADH was enhanced by increasing the copy number of *Bagdh*, and a recombinant strain *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* was constructed to address the imbalance between cofactor amount and key enzyme expression level in the two-enzyme cascade catalytic reaction. An optimized whole cell transformation process was conducted under 30 °C, initial pH 6.5, cell mass ( $OD_{600}$ ) 30, 100 g/L D-fructose substrate and an equivalent molar concentration of glucose. The highest yield of D-mannitol was 81.9 g/L with a molar conversion rate of 81.9% in 5 L fermenter under the optimal conversion conditions. This study provides a green and efficient biotransformation method for future large-scale production of D-mannitol, which is also of great importance for the production of other sugar alcohols.

**Keywords:** D-mannitol; mannitol dehydrogenase; two-enzyme cascade coordinated expression; NADH regeneration; whole cell catalysis

D-甘露醇是一种天然的六碳糖醇, 与山梨糖醇互为同分异构体, 已被证明是抗肿瘤药<sup>[1]</sup>和免疫刺激剂<sup>[2]</sup>的重要前体, 因其特殊的生理功能, 在食品、医疗和化工行业中广泛使用<sup>[3]</sup>。天然的 D-甘露醇存在于多种植物中, 例如海藻、橄榄、南瓜和芹菜等<sup>[4]</sup>, 其甜度相当于蔗糖甜度的 62%, 并且甜度不会随浓度的增加而增加<sup>[5]</sup>。据报道, D-甘露醇甜度适中, 在人体内代谢过程中几乎不会引起血糖水平的变化, 因此作为甜味剂供糖尿病人群使用<sup>[6]</sup>。D-甘露醇的热量低于其他糖醇类, 热值仅为 3.75 kcal/g<sup>[7]</sup>, 适用于

身体肥胖人群作为低热量代餐品食用<sup>[8]</sup>。此外, D-甘露醇具备低吸湿性和抗氧化性, 可以作为一种良好的药物赋形剂, 用于延长药品的保质期<sup>[5]</sup>; 其清凉的甜味可以掩盖药品的不良味道<sup>[9]</sup>; 具有强效的渗透性<sup>[6]</sup>, 是良好的利尿剂, 并用作减少大脑和细胞水肿的渗透剂等<sup>[10]</sup>。

目前, D-甘露醇的生产方法主要有 3 种, 分别是植物提取法、化学合成法和微生物转化法<sup>[11]</sup>。植物提取法主要是从海藻中提取<sup>[4]</sup>, 包括冷却结晶法和超声波辅助提取技术<sup>[12]</sup>。植物提取法由于被提取植物受地域和季节的限制, 以

及提取过程中蒸发浓缩需要高温等严格的条件,大大增加了生产成本。海带提取法生产 D-甘露醇耗能高,对环境污染较大,正逐渐被淘汰。化学法合成 D-甘露醇涉及到苛刻的反应条件和复杂的化学反应,主要是通过葡萄糖和果糖的混合物催化加氢制得<sup>[13]</sup>,该反应在高温和强酸条件下进行,并且需要一种或者几种金属催化剂催化反应,它是目前工业上普遍采用的甘露醇生产方法,但由于其生产过程副产物山梨醇的大量积累,甘露醇的分离成本高昂<sup>[11]</sup>。因此,开发一种高效、绿色及低成本的甘露醇生产方法具有非常重要的意义。

近年来,微生物转化法制备甘露醇引起了广泛的关注<sup>[4]</sup>,主要包括微生物发酵法、酶转化法和全细胞转化法<sup>[14]</sup>。发酵法是利用微生物直接发酵生产 D-甘露醇,传统诱变技术和代谢工程策略用于提高 D-甘露醇产量<sup>[4]</sup>。2013 年, Savergave 等<sup>[15]</sup>利用紫外诱变获得一株木兰念珠菌 (*Candida magnoliae*) 突变体 R9 并优化发酵工艺, D-甘露醇产率为 81%。2014 年, Papagianni 等<sup>[16]</sup>加强了罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri* ATCC 55730) 的糖酵解途径,提高了 NADH 的利用率,使果糖更有效地转化为 D-甘露醇,重组菌发酵 100 h 后 D-甘露醇产量为 56 g/L。发酵法生产 D-甘露醇存在发酵周期长、培养基成本高<sup>[17]</sup>、副产物多等问题<sup>[18]</sup>。酶催化法合成 D-甘露醇是通过外源添加纯酶和辅因子催化底物反应,该方法在工业生产中,必须精确控制反应器的温度,反应条件苛刻且纯酶提取操作难度大。尽管已有一些产 MDH 的嗜高温微生物被挖掘,例如荧光假单胞菌<sup>[19]</sup> (*Pseudomonas fluorescens*),但是其 D-甘露醇的产量很低。另外,外源添加辅因子更是增加了生产成本<sup>[20]</sup>,因此酶法不适用于工业大规模生产 D-甘露醇。全细胞催化法<sup>[21]</sup>是介于发酵法和酶催化法之间

的一种生物催化技术,具有条件温和、副产物少和收率高等优势。目前,合成 D-甘露醇的底物主要是以葡萄糖、果糖和蔗糖为主<sup>[11]</sup>。其中,果糖可以在辅因子参与和甘露醇脱氢酶 (mannitol dehydrogenase, MDH, EC: 1.1.1.67) 催化下,直接合成 D-甘露醇,从价格成本上来讲,以果糖为底物合成甘露醇的方法能够从价格相对低廉的产品出发合成高价值的产物 D-甘露醇,有很高的工业转化价值。甘露醇脱氢酶作为 D-甘露醇合成途径中的关键酶,需要在辅因子 NADH 或 NADPH 的协同作用下才能催化反应。构建辅酶体系常见辅酶包括葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 和甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH)<sup>[11]</sup>。2004 年, Kaup 等<sup>[21]</sup>带领团队利用基因工程的方法,首次在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中开发了将果糖转化为 D-甘露醇的全细胞催化体系,该方法反应高效且过程成本低,解决了辅酶外源添加的问题。此后, Bäumchen 等<sup>[22]</sup>在谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 中建立了 D-甘露醇的全细胞催化系统。以上体系的构建一定程度上解决了外源添加辅因子时增加生产成本的问题。全细胞催化合成 D-甘露醇的影响因素主要包括关键酶甘露醇脱氢酶的活性和催化条件、细胞对底物的消耗、辅酶和能量供应的不平衡和产物的分解利用转运等<sup>[17]</sup>。

因此,构建单细胞工程菌合成甘露醇是一个很好的选择。考虑到还原性辅酶稳定性差、价格昂贵不适合外源添加等问题<sup>[21]</sup>,本研究首先通过异源筛选获得了较优的辅酶葡萄糖脱氢酶 (*BaGDH*) 与甘露醇脱氢酶 (*LpMDH*) 在大肠杆菌中进行共表达构建了单细胞工厂 (图 1),接着通过平衡双酶催化速率策略及优化反应条件,实现 D-果糖到 D-甘露醇的高效合成。旨在解决双酶级联催化反应中辅酶再生用酶与催化

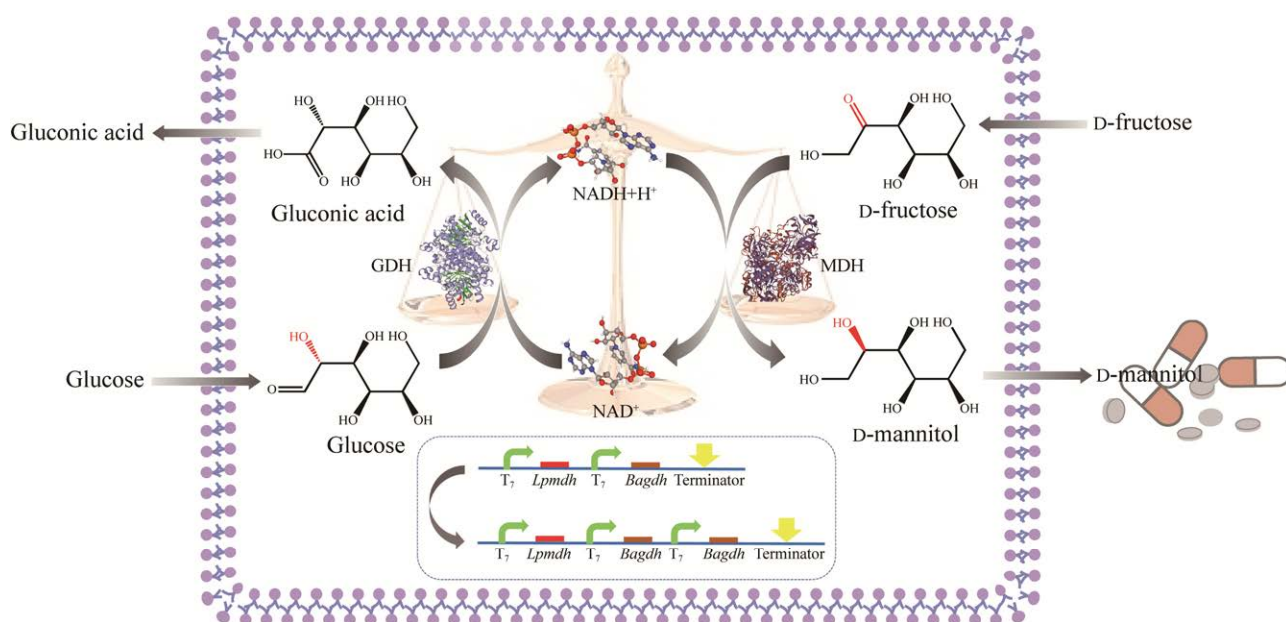


图1 大肠杆菌全细胞催化合成D-甘露醇的构建策略

Figure 1 The strategy for production of D-mannitol using whole-cell biocatalyst of *Escherichia coli*.

用酶表达量不协调的问题，提高辅因子循环能力，建立一种简洁、高效、经济的生物催化方法，为工业化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109、*E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保藏，表达载体 pETDuet 购自 Novagen 公司。

#### 1.1.2 酶和试剂

*EcoR* I、*Hind* III、*Nde* I 等限制性核酸内切酶与 DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司；小量质粒提取试剂盒、同源重组试剂盒和胶回收试剂盒购于南京诺维赞生物科技有限公司；D-甘露醇、甘油和 D-果糖等分析纯试剂均购于上海麦克林生化科技有限公司；其余色谱纯试剂及分析纯试剂购自国药集团。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计

通过 NCBI 获得假肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc pseudomesenteroides*)、肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 和假单胞菌 (*Pseudomonas bacterium* 1109) 来源的甘露醇脱氢酶基因 *LpmDH*<sup>[21]</sup> (GenBank 登录号: AJ486977)、*Lmmdh*<sup>[23]</sup> (GenBank 登录号: AY090766) 和 *Pbmdh*<sup>[24]</sup> (GenBank 登录号: KLU39398.1)，解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 来源的葡萄糖脱氢酶基因 *Bagdh*<sup>[25]</sup> (GenBank 登录号: 66327597) 以及博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 来源的甲酸脱氢酶 *Cbmdh*<sup>[26]</sup> (GenBank 登录号: 7657866) 的基因序列，选择合适的酶切位点，设计并合成同源臂引物，6 个组氨酸标签添加于 N 端用于酶的纯化。本研究使用的引物序列参见表 1。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
pETDuet- <i>Lpmdh</i> -F	CCACAGCCAGGATCCGAATTCAAGCATGGAAGCACTTGTGTAACTGGTA	50
pETDuet- <i>Lpmdh</i> -R	GCATTATGCGGCCGCAAGCTTTTATGCCTCTTCGCCACCAAC	42
pETDuet- <i>Pbmdh</i> -F	CCACAGCCAGGATCCGAATTCAAGCATGAAAGCAGCAGTGTTTCATGG	47
pETDuet- <i>Pbmdh</i> -R	GCATTATGCGGCCGCAAGCTTTTACGGCTTTACCAACACCTTAATGGA	48
pETDuet- <i>Lmmdh</i> -F	CCACAGCCAGGATCCGAATTGATGGAAGCACTTGTCTAACCGBA	46
pETDuet- <i>Lmmdh</i> -R	GCATTATGCGGCCGCAAGCTTTTATGCCTCTTCGCCGCCA	40
pETDuet- <i>Cbfdh</i> -F	CCACAGCCAGGATCCGAATTCAAGCATGAAGATCGTTTATGCTTATATGATGCTGG	57
pETDuet- <i>Cbfdh</i> -R	GCATTATGCGGCCGCAAGCTTTTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAAGCTTTGGTA	55
pETDuet- <i>Bagdh</i> -F	CCACAGCCAGGATCCGAATTCAAGCATGGAAGCACTTGTGTAACTGGTAC	51
pETDuet- <i>Bagdh</i> -R	TTTACCAGACTCGAGGGTACCTTAACCGCGGCCTGCCT	38
pETDuet- <i>Lpmdh</i> - <i>Cbfdh</i> -F	TAAGAAGGAGATATACATATGATGAAGATCGTTTTAGTCTTATATGATGCTGG	53
pETDuet- <i>Lpmdh</i> - <i>Cbfdh</i> -R	TTTACCAGACTCGAGGGTACCTTATTTCTTATCGTGTTTACCGTAAGCTTTGGTAA	56
pETDuet- <i>Lpmdh</i> - <i>Bagdh</i> -F	TAAGAAGGAGATATACATATGATGTATCCGGATTAAAAAGGAAAAGTCGT	50
pETDuet- <i>Lpmdh</i> - <i>Bagdh</i> -R	TTTACCAGACTCGAGGGTACCTTAACCGCGGCCTGCC	37

The italic sequences are the restriction enzyme cutting sites.

### 1.2.2 培养基与培养方法

LB 培养基 (g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, 氯化钠 10。

TB 培养基 (g/L): 酵母粉 12, 胰蛋白胨 24,  $K_2HPO_4$  12.5,  $KH_2PO_4$  2.3, 每升培养基添加甘油 4.0 mL。

发酵培养基 (g/L): 酵母粉 20, 蛋白胨 20, 葡萄糖 60, 磷酸二氢钾 5, 磷酸氢二钾 5, 柠檬酸钠 5, 尿素 3, 七水合硫酸镁 2, 硫酸锌 0.1, 初始 pH 7.0–7.2。

摇瓶培养与诱导条件: 以 2% (V/V) 的接种量, 接种于 50 mL TB 培养基中, 添加终浓度为 0.1 mmol/L 的  $Amp^+$ , 37 °C、200 r/min 培养至  $OD_{600}$  约为 0.8 时, 添加终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 于 20 °C 下诱导 12–14 h。

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  $Amp^+$ , 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 h。

5 L 发酵罐培养与诱导条件: 将种子培养液

按照 5% (V/V) 接种量转接于 5 L 发酵罐, 初始发酵温度 37 °C, 通气量 1.2 vvm, 发酵前 2 h 控制转速 300 r/min, 之后 3 h 内转速逐级升至 600 r/min, 培养  $OD_{600}$  至 15–20 时, 加入终浓度约为 0.3 mmol/L 的 IPTG 于 25 °C 诱导表达 12–14 h。

### 1.2.3 重组大肠杆菌的构建

分别以博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7) 的全基因组为模板, 使用特异性引物克隆获得葡萄糖脱氢酶基因片段 *Bagdh* 和甲酸脱氢酶基因片段 *Cbfdh*, 与经限制性内切酶 (*Nde* I 和 *Kpn* I) 双酶切后的质粒 pETDuet 利用同源重组酶连接, 转化入 *E. coli* BL21 中构建 *E. coli* BL21/pETDuet-*Bagdh* 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*Cbfdh* 菌株。*Lpmdh*、*Lmmdh* 和 *Pbmdh* 基因由 Vazyme Biotech 公司合成, 未经密码子优化, 获得质粒 pET28a-*Lpmdh*、pET28a-*Lmmdh* 和 pET28a-*Pbmdh*。用同样的方法, 以质粒 pET28a-*Lpmdh*、pET28a-*Lmmdh* 和 pET28a-*Pbmdh*

为模板构建菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*、*E. coli* BL21/pETDuet-*Lmmdh* 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*Pbmdh*。以质粒 pETDuet-*Bagdh* 为模板, 使用引物克隆获得基因片段 *Bagdh*, 与经限制性内切酶 (*Nde* I 和 *Kpn* I) 双酶切后的质粒 pETDuet-*Lpmdh* 利用同源重组法连接转化入 *E. coli* BL21 中构建 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh* 菌株。用同样方法构建重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lmmdh-Bagdh*、*E. coli* BL21/pETDuet-*Pbmdh-Bagdh* 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*mdh-Bagdh-Bagdh*。

#### 1.2.4 粗酶的提取与纯化

以 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集诱导好的菌体, 用 50 mmol/L PB 缓冲液 (pH 6.5) 洗涤菌体 3 次, 用 PB 缓冲液悬浮并浓缩菌体 10 倍。接着使用超声细胞破碎仪进行细胞破碎, 工作条件为工作 1 s, 间歇 3 s。细胞破碎液经 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后, 用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤处理, 利用亲和层析镍柱进行纯化, 得到的纯酶通过 SDS-PAGE 进行检测。

#### 1.2.5 酶活检测方法

MDH 酶活力测定方法<sup>[27]</sup>: 反应体系 (1 mL) 包括 50 mmol/L PB 缓冲液 (pH 6.5)、0.2 mmol/L D-果糖和 0.5 mmol/L NADH。加入 10  $\mu$ L 适量稀释的待测样品启动反应并计时, 每 10 s 记录一次 340 nm 处的吸光值, 根据反应液吸光值的增量, 计算出 NAD<sup>+</sup> 的浓度, 从而得到甘露醇脱氢酶酶活。甘露醇脱氢酶酶活单位 (U) 定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol NAD<sup>+</sup> 所需的酶量。

GDH 酶活力测定方法<sup>[27]</sup>: 反应体系 (1 mL) 包括 50 mmol/L PB 缓冲液 (pH 7.0)、10 mmol/L NAD<sup>+</sup> 溶液, 1 mmol/L 葡萄糖溶液。加入 10  $\mu$ L 适量稀释的待测样品启动反应并计时, 每 10 s 记录一次 340 nm 处的吸光值, 根据反应液吸光值的增量, 计算出 NADH 的浓度, 从而得到

葡萄糖脱氢酶酶活。葡萄糖脱氢酶酶活单位 (U) 定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol NADH 所需的酶量。

FDH 酶活力测定方法<sup>[21]</sup>: 反应体系 (1 mL) 包括 50 mmol/L PB 缓冲液 (pH 7.0), 167 mmol/L 甲酸钠溶液和 1.67 mmol/L NAD<sup>+</sup>。加入 10  $\mu$ L 适量稀释的待测样品启动反应并计时, 每 10 s 记录一次 340 nm 处的吸光值, 根据反应液吸光值增量, 计算出 NADH 的浓度, 从而得到甲酸脱氢酶酶活。甲酸脱氢酶酶活单位 (U) 定义为每分钟产生 1  $\mu$ mol NADH 所需的酶量。

蛋白浓度通过牛血清蛋白法测得<sup>[28]</sup>。比活力为每毫克蛋白质所具有的酶活力单位数, 一般用酶活力单位/mg 蛋白质表示。

#### 1.2.6 体外优化多酶催化体系

在优化多酶催化体系中, 首先加入 *LpMDH* 酶活为 15 U/mL, *BaGDH* 酶活为 20 U/mL, 其次通过改变 *LpMDH* 与 *BaGDH* 的酶活比例从 0.5 : 1.0–4.0 : 1.0 来进行反应。反应体系为: 20 g/L D-果糖溶解在终体积为 10 mL 的 50 mmol/L PB 缓冲液 (pH 6.5) 中, 分别将纯酶 *LpMDH* 和 *BaGDH* 按不同比例添加至转化液中, 30 °C、150 r/min 条件下进行酶法转化, 反应 4 h 后, 通过 HPLC 测量反应溶液中的残余 D-果糖和 D-甘露醇的量。

#### 1.2.7 全细胞转化条件

摇瓶转化条件: 回收细胞重悬于 PB 缓冲液中 (pH 6.5), 反应终体积为 50 mL, 菌体量  $OD_{600}=30$ , D-果糖浓度 100 g/L, 加入的辅底物与底物 (葡萄糖/D-果糖) 的摩尔比为 1 : 1, 在 30 °C 和 160 r/min 条件下转化 48 h。在转化过程中, 使用八联瓶 pH 控制器在线控制 pH 为 6.5。反应过程中及反应结束后取样, 将样品煮沸 5 min 终止反应, 取 1 mL 转化液离心并进行适当稀释, 使用 HPLC 分析残留的 D-果糖、辅底物葡萄糖及产物 D-甘露醇的含量。

5 L 发酵罐转化条件: 回收细胞重悬于 PB 缓冲液中(pH 6.5), 反应终体积为 1 L, 菌体量  $OD_{600}=30$ , 在 0 h 投入 D-果糖 100 g/L, 加入的辅底物与底物 (葡萄糖/D-果糖) 的摩尔比为 1:1, pH 6.5 和 160 r/min 条件下转化 48 h。反应过程中及反应结束后取样, 将样品煮沸 5 min 终止反应, 取 1 mL 转化液离心并进行适当稀释, 使用 HPLC 分析残留的 D-果糖、辅底物葡萄糖及产物 D-甘露醇含量。

### 1.2.8 HPLC 检测条件

底物 D-果糖和辅底物葡萄糖及产物 D-甘露醇均可通过 HPLC 测定。使用安捷伦 1260 高效液相色谱 RID 检测器分析, 分析条件为: Hi-Plex Ca 型色谱柱 (300 mm×7.7 mm, 安捷伦), 柱温为 80 °C, 检测温度为 55 °C, 流速为 0.4 mL/min, 流动相为超纯水, 单个样品运行时间为 35 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 关键途径酶的筛选

#### 2.1.1 甘露醇脱氢酶基因的克隆与表达

MDH 是 D-甘露醇合成路径中的关键酶, 从 NCBI 库中分别检索到来源于假肠膜明串珠菌 (*L. pseudomesenteroides*)、肠膜明串珠菌 (*L. mesenteroides*) 以及假单胞菌 (*P. bacterium* 1109) 的甘露醇脱氢酶的序列, 长度分别为 1 017 bp、1 017 bp、1 020 bp, 按照 1.2.3 方法构建基因工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*、*E. coli* BL21/pETDuet-*Lmmdh* 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*Pbmdh*。粗酶液和纯酶 SDS-PAGE 分析如图 2 所示, 在 37.6 kDa、37.9 kDa 和 38.3 kDa 有明显条带, 这表明基因 *Lpmdh*、*Lmmdh* 和 *Pbmdh* 均能在 *E. coli* BL21 中表达。

#### 2.1.2 甘露醇脱氢酶的酶活及酶学性质

将得到的纯酶液按照方法 1.2.5 检测其酶

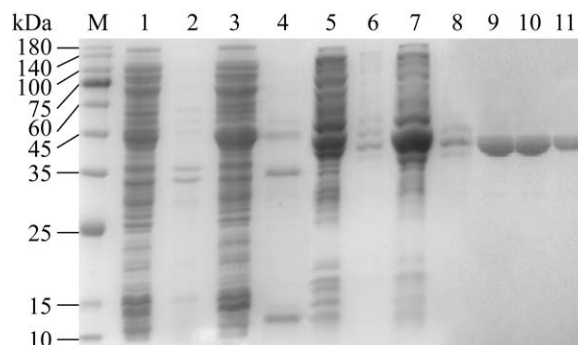


图 2 *Lpmdh*、*Lmmdh* 和 *Pbmdh* 过表达重组菌株粗酶液及纯酶 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli* and purified proteins. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21/pETDuet cell breaking supernatant (CBS); 2: *E. coli* BL21/pETDuet cytoplasmic precipitation (CP); 3: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lmmdh* CBS; 4: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lmmdh* CP; 5: *E. coli* BL21/pETDuet-*Pbmdh* CBS; 6: *E. coli* BL21/pETDuet-*Pbmdh* CP; 7: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh* CBS; 8: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh* CP; 9: purified *LpMDH*; 10: purified *LmMDH*; 11: purified *PbMDH*.

活力, 得到 *LpMDH*、*LmMDH* 和 *PbMDH* 的酶活力分别为 18.1 U/mg、16.9 U/mg 和 15.4 U/mg。在不同温度条件下测定 3 种来源的甘露醇脱氢酶的酶活力, *LpMDH*、*LmMDH* 和 *PbMDH* 的酶活力曲线如图 3A 所示。*LpMDH* 和 *LmMDH* 的最适温度为 30 °C, 高于 30 °C 酶活力急剧下降, *LpMDH* 和 *LmMDH* 的耐热性较差; *PbMDH* 的最适温度为 60 °C, 且在 45–65 °C 温度范围内酶活力均能维持在 70% 以上, 说明 *PbMDH* 的耐热性较强, 更适用于工业生产。3 种不同来源 MDH 的温度稳定性测试如图 3B 所示, *LpMDH* 在温度高于 35 °C 条件下保温 12 h 后, 残余酶活力小于 50%; *PbMDH* 在 35–50 °C 范围内保存 12 h 残余酶活力均高于 50%, 这表明 *PbMDH* 的耐热性和温度稳定性较其他 2 个酶强, 更具工业应用价值。

在不同 pH 条件下 (图 3C), *LpMDH* 和

*LmMDH* 的最适 pH 为 6.5, *PbMDH* 最适 pH 为 8.0。 *LpMDH* 和 *LmMDH* 在 pH 6.0–7.0 的残余酶活力均保持在 80% 以上; 在 pH 8.0–10.0 时酶活力迅速下降, 低于 50%, 可见 *LpMDH* 和 *LmMDH* 耐弱酸性能较强, 耐碱性能较弱。 *PbMDH* 在 pH 6.0–8.5 的残余酶活力保持在 80% 以上; 当 pH 低于 6.0 或高于 8.0 时, 残余酶活力下降, 下降程度相比其他来源的酶较小; 当 pH 低于

6.0 或高于 9.0 时, 残余酶活力皆高于其余 2 个来源的酶活, 由此可见 *PbMDH* 耐酸碱能力相对较强。 3 种不同来源 MDH 的 pH 稳定性测试如图 3D 所示, 在保温 12 h 后, *LpMDH* 和 *LmMDH* 在 pH 5.5–7.0 范围内残余酶活力高于 50%, *PbMDH* 在 pH 4.0–6.5 范围内残余酶活力低于 50%, 这表明 *LpMDH* 和 *LmMDH* 的耐酸性较 *PbMDH* 强, 适合弱酸性条件的生物转化。在

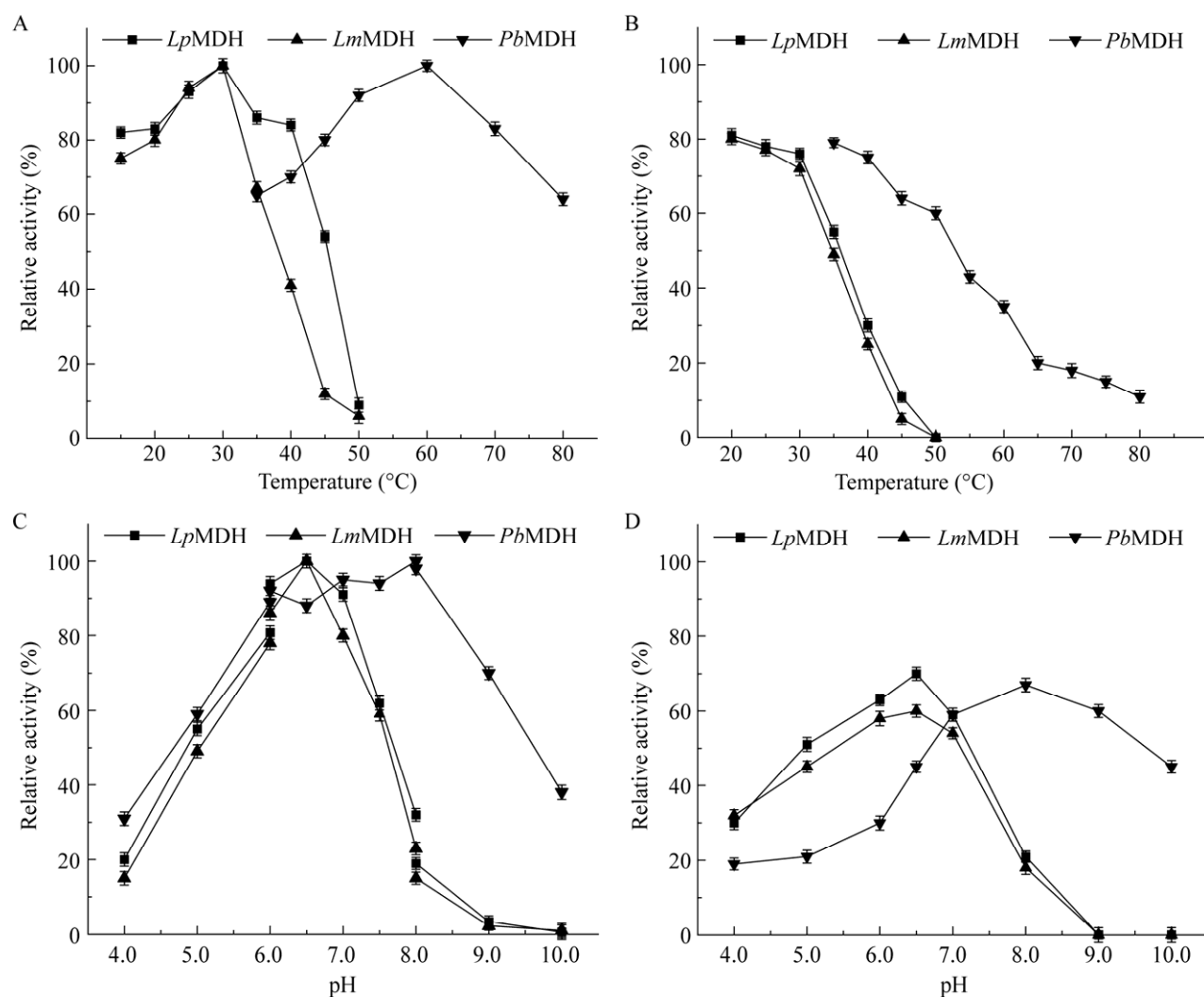


图 3 *LpMDH*、*LmMDH* 和 *PbMDH* 的最适反应温度 (A)、温度稳定性 (B)、最适反应 pH (C)、pH 稳定性 (D)

Figure 3 Optimal temperature (A), temperature stability (B), optimal pH (C), and pH stability (D) of *LpMDH*, *LmMDH* and *PbMDH*. pH 3.0–6.0: citric acid-sodium citrate buffer; pH 6.0–8.0: MES buffer; pH 8.0–10.0: glycine-sodium hydroxide buffer.



pH 7.0–10.0 范围内, *PbMDH* 残余酶活力高于 40%, 优于其他 2 个来源的酶, 这表明其具有较强耐碱性。在糖醇催化反应中, 弱酸环境可以一定程度上抑制碳水化合物的美拉德反应<sup>[6]</sup>, 防止非酶褐变<sup>[27]</sup>和减少副产物<sup>[28]</sup>, *LpMDH* 具有适合该反应的 pH 条件。

在对 3 种不同来源 MDH 酶学性质研究的基础上, 验证其转化 D-果糖的能力。验证 *LpMDH*、*LmMDH* 和 *PbMDH* 在辅酶充足的条件下, 转化 D-果糖的效率 (反应体系为: 20 g/L D-果糖溶解在终体积为 10 mL 的 50 mmol/L PB 缓冲液中, 分别添加 10 U/mL 的纯酶 *LpMDH*、*LmMDH* 和 *PbMDH*, 添加辅因子 NADH 的终浓度为 20 mmol/L, 最适温度下, 150 r/min 进行酶法转化, 反应 6 h)。反应结果如图 4 所示, 在辅酶充足的条件下, *LpMDH* 催化果糖生成 D-甘露醇的效率最高, 甘露醇的摩尔转化率达 82.3%。综合以上酶学性质及 D-果糖转化能力的研究结果, *LpMDH* 为后续转化的最佳关键酶。在 D-果糖转化反应结束后, 体系中仍有部分底物剩余, 推测可能在转化后期 *LpMDH* 酶活力不断降低导致催化反应达到了极限。

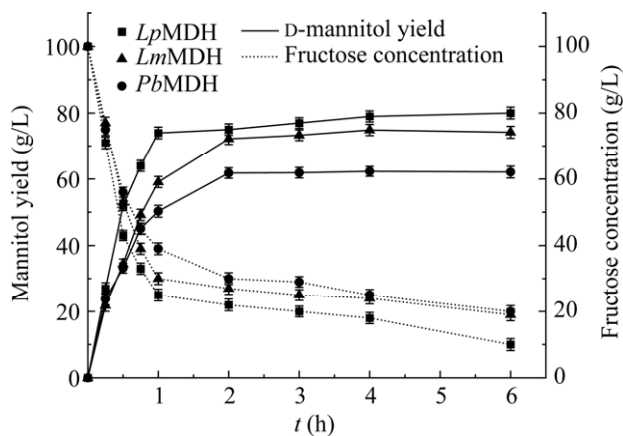


图 4 D-甘露醇生物转化

Figure 4 D-mannitol biotransformation process.

## 2.2 NADH 再生体系的筛选及优化

### 2.2.1 辅酶循环用酶的筛选

D-果糖合成 D-甘露醇过程中需要不断消耗 NADH, 由于 NADH 价格昂贵且稳定性差, 寻求一种绿色高效的辅酶再生体系是改善这一问题的有效方法。目前关于酶法合成 D-甘露醇的研究中, 报道的辅酶 (NADH) 再生系统主要有 2 种: 一是葡萄糖脱氢酶再生系统, 葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 催化葡萄糖生成葡萄糖酸盐并使得 NADH 再生<sup>[29]</sup>, 该系统生成的副产物会影响反应体系的 pH, 不利于产物的分离; 另一种是甲酸脱氢酶再生系统, 甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH) 催化甲酸生成 CO<sub>2</sub>, 同时提供 H 使得 NADH 再生, 这一系统操作方便、无副产物<sup>[21]</sup>, 但是目前报道的甲酸脱氢酶都存在酶活低和转化效率低等问题。

基于以上研究现状, 利用 pETDuet 载体分别过表达 *Bagdh* 和 *Cbfdh* 基因, 构建重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Bagdh* 和 *E. coli* BL21/pETDuet-*Cbfdh*, 用于 NADH 辅酶体系的筛选。为了验证 *BaGDH* 的转化能力, 在 20 mL 的转化体系中添加 10 g/L D-果糖、10 g/L 葡萄糖、酶活力均为 1.0 U/mL 的 *LpMDH* 和 *BaGDH* 粗酶液; *CbFDH* 的转化体系中添加 10 g/L D-果糖、3.8 g/L 甲酸钠、酶活均为 1.0 U/mL 的 *LpMDH* 和 *CbFDH* 粗酶液。在温度 30 °C, pH 6.5, 转速 150 r/min 的反应条件下转化 2 h, 结果如图 5, *CbFDH* 和 *BaGDH* 催化 D-甘露醇平均生成速率分别为 0.21 g/(L·min)、0.43 g/(L·min), D-甘露醇的摩尔转化率分别为 25.2% 和 51.9%。以上结果显示, *BaGDH* 的反应速率较快且 D-甘露醇摩尔转化率是 *CbFDH* 的 2.1 倍, 因此将 *BaGDH* 作为辅酶再生用酶用于 D-甘露醇的合成。

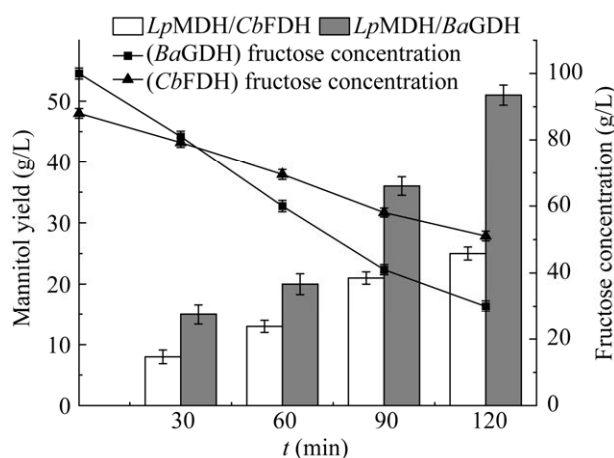


图5 *BaGDH* 和 *CbFDH* 对甘露醇生物转化的影响  
Figure 5 Effects of *BaGDH* and *CbFDH* on mannitol biotransformation.

### 2.2.2 *LpMDH* 和 *BaGDH* 的酶量适配

*BaGDH* 被筛选用于提供辅因子 NADH 再生, 2.2.1 结果显示反应体系中 *LpMDH* 与 *BaGDH* 添加比例为 1:1 时, D-甘露醇摩尔转化率为 51.9%, 而 2.1.2 结果显示添加足量辅因子 NADH 时 D-甘露醇摩尔转化率可达 82.3%。由此推测, D-甘露醇的转化率降低是由于 *BaGDH* 的添加比例不足使得辅因子 NADH 供应不足从而导致催化效率低下。为了解决这一问题, 接下来探究 *LpMDH* 和 *BaGDH* 最佳适配比, 将 *LpMDH* 和 *BaGDH* 的粗酶液按照不同比例添加反应体系中体外转化 D-果糖合成 D-甘露醇。结果如图 6 所示, D-甘露醇的摩尔转化率和平均反应速率均随添加比例的增加而增加, 当 *BaGDH*:*LpMDH*  $\geq 4:1$  时, 产物的转化率趋于平稳。因此 *BaGDH* 和 *LpMDH* 的最适添加比例为 4:1, 此时 D-甘露醇的产量达到最高为 82.1 g/L, D-甘露醇平均生成速率为 0.68 g/(L·min), 转化过程中的催化速率显著提高。

## 2.3 共表达重组大肠杆菌的构建与优化

### 2.3.1 D-甘露醇的初步转化

按照方法 1.2.3, 在 *E. coli* BL21 中串联表

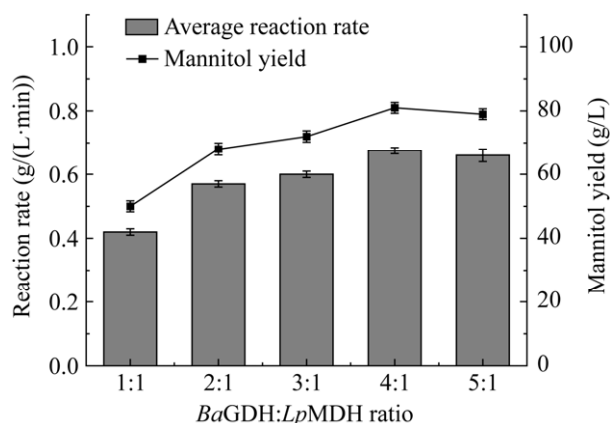


图6 *BaGDH* 和 *LpMDH* 添加比例优化  
Figure 6 Optimization of the ratio of *BaGDH* to *LpMDH*.

达基因 *Lpmdh* 和 *Bagdh*, 获得重组菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh* 后, 进行摇瓶培养并诱导表达, 收集菌体后洗涤并悬浮, 按照方法 1.2.4 破细胞得到粗酶液, 将其粗酶液进行 SDS-PAGE 分析 (图 7B), 结果显示在 29.8 kDa 和 40.15 kDa 有明显条带, 证明基因 *Bagdh* 和 *Cbfdh* 串联后能够在 *E. coli* BL21 中可溶性表达。按照方法 1.2.7, 收集诱导表达后的重组大肠杆菌进行全细胞转化, 转化 12 h D-果糖浓度为 47.7 g/L, D-甘露醇生成 52.2 g/L; 转化 24 h 底物浓度为 36.9 g/L, D-甘露醇生成 59.7 g/L; 转化 36 h 后 D-甘露醇浓度基本保持不变 (图 7C)。以上结果表明, 转化前 12 h 底物被快速大量消耗, 随后消耗速率逐渐变缓。在体外优化粗酶 *LpMDH* 和 *BaGDH* 比例时 (图 6), *BaGDH* 和 *LpMDH* 的最佳比例为 4:1, *BaGDH* 的添加量远远大于 *LpMDH* 的量, 这表明串联表达这 2 个基因后, *BaGDH* 的表达量明显不足导致辅因子 NADH 供应不足。测定全细胞转化前后重组菌中双酶酶活, 反应前 *LpMDH* 和 *BaGDH* 酶活分别为 13.6 U/mL 和 6.9 U/mL (表 2), 24 h 后 *LpMDH* 和 *BaGDH* 酶活分别降低至 9.1 U/mL

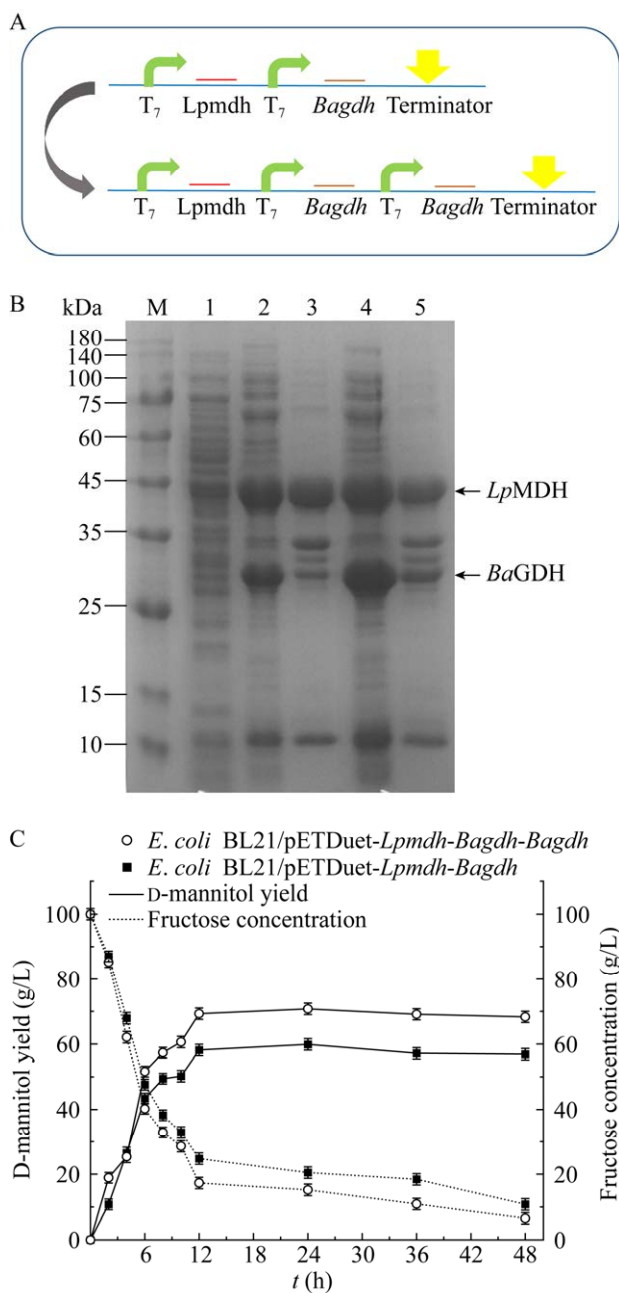


图7 共表达重组大肠杆菌的构建与优化

Figure 7 Construction and optimization of recombinant *E. coli*. (A) Schematic diagram of gene double copy tandem. (B) SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21/pETDuet CBS; 2: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh* CBS; 3: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh* CP; 4: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh*-*Bagdh* CBS; 5: *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh*-*Bagdh* CP. (C) Biotransformation of co-expressed recombinant strain.

和 2.3 U/mL, 进一步说明影响反应速率的因素是辅酶催化效率较低和双酶表达不协调。

### 2.3.2 增加 *Bagdh* 拷贝量优化辅酶体系

基于体外 *LpMDH* 和 *BaGDH* 的酶量适配优化结果, 通过增加辅酶 *BaGDH* 拷贝量来提高基因表达水平。按照方法 1.2.3, 在 *E. coli* BL21 中增加 *Bagdh* 拷贝量, 获得基因工程菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh*-*Bagdh* 后, 进行摇瓶培养并诱导表达, 收集菌体后洗涤并悬浮。按照方法 1.2.4 破细胞得到粗酶液, 将其粗酶液进行 SDS-PAGE 分析 (图 7B), 结果显示双拷贝 *Bagdh* 对比单拷贝表达量增多, 粗酶液酶活分别为 13.7 U/mL 和 6.9 U/mL (表 2), 表达量明显增加且酶活提高 1 倍。在此基础上, 利用优化后的重组大肠杆菌进行全细胞转化 (图 7C), 转化 24 h 果糖浓度为 15.1 g/L, D-甘露醇生成 71.8 g/L, 摩尔转化率为 71.8% 是未优化菌株产率的 1.2 倍。以上结果表明, 提高 *Bagdh* 的拷贝量可以提高辅酶再生能力并使双酶协调表达, 从而增强 D-甘露醇的合成能力。

考虑到双拷贝 *Bagdh* 在传代过程中表达的稳定性, 在重组菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh*-*Bagdh*-*Bagdh* 多次传代后, 分别提取 50 代和 100 代细胞的重组质粒进行 PCR 验证 (图 8A), 所有样品在 1 667 bp 处有明显条带, 证明没有出现质粒丢失和基因重组的情况。对 50 和 100 代菌株粗酶液进行 SDS-PAGE 分析 (图 8B), 蛋白条带无明显变化, 说明基因 *Lpmdh* 和 *Bagdh* 表达量稳定。利用多次传代后的细胞进行全细胞转化 (图 8C), 结果显示 D-甘露醇的产量基本处于同一水平。以上结果说明了该工程菌在传代过程中较稳定。

### 2.4 全细胞转化体系的优化

#### 2.4.1 温度对全细胞转化合成 D-甘露醇的影响

转化温度会通过影响菌体的生长状态以及

表 2 *LpMDH*、*CbFDH* 以及 *BaGDH* 在大肠杆菌中的酶活力Table 2 Enzyme activities of *LpMDH*, *CbFDH* and *BaGDH* in *E. coli*

Strains	<i>LpMDH</i> (U/mL)	<i>BaGDH</i> (U/mL)	<i>CbFDH</i> (U/mL)
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet	/	/	/
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>Lpmdh</i>	15.7±0.2	/	/
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>Cbfdh</i>	/	/	0.6±0.1
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>Bagdh</i>	/	7.6±0.2	/
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>Lpmdh-Bagdh</i>	13.6±0.3	6.9±0.2	/
<i>E. coli</i> BL21/pETDuet- <i>Lpmdh-Bagdh-Bagdh</i>	12.5±0.2	13.7±0.2	/

The “/” means no enzyme activity.

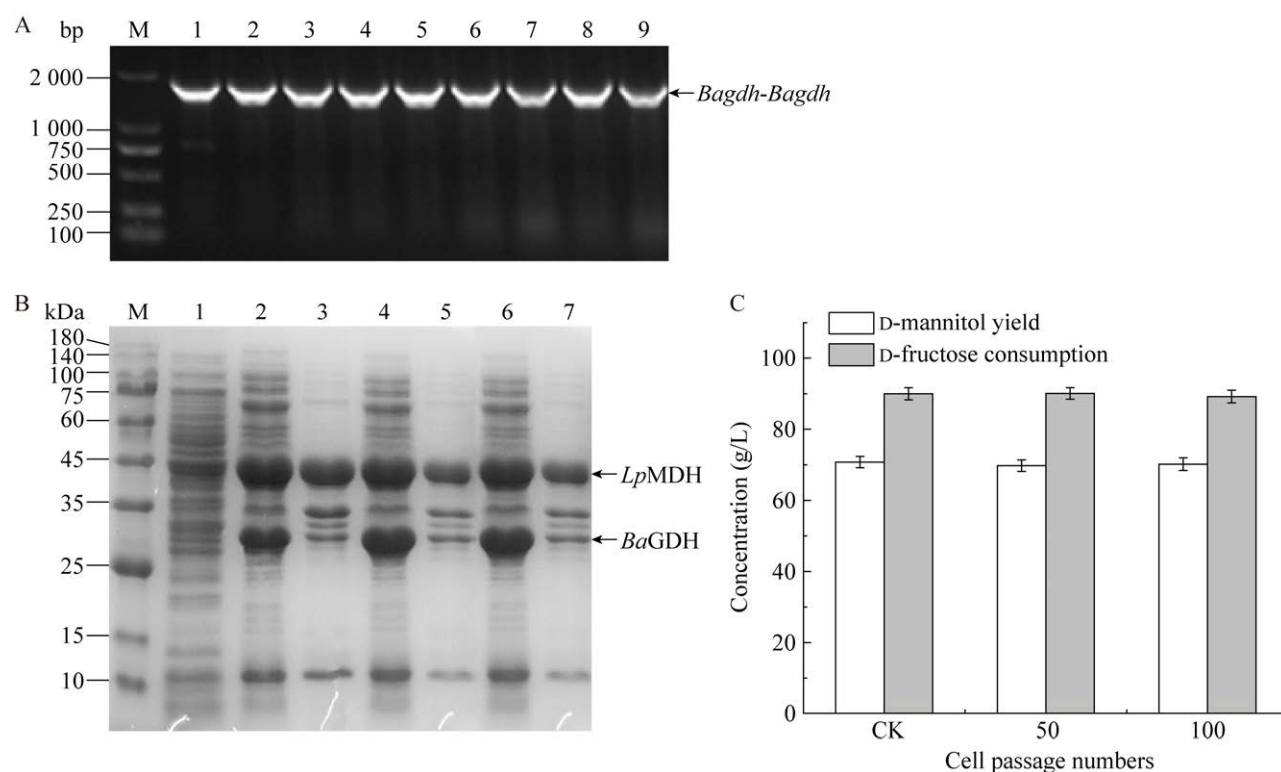


图 8 共表达重组大肠杆菌稳定性验证

Figure 8 Stability verification of recombinant *E. coli*. (A) *E. coli* BL21 recombinant plasmid PCR verification. M: DNA 2 000 bp marker; 1–3: gene *Bagdh-Bagdh* (CK); 4–6: gene *Bagdh-Bagdh* (50 passages of cells); 7–9: gene *Bagdh-Bagdh* (100 passages of cells). (B) SDS-PAGE analysis of recombinant *E. coli*. BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*. M: protein marker; 1: *E. coli* BL21/pETDuet CBS; 2: control group CBS; 3: control group CP; 4: 50 passages of CBS; 5: 50 passages of cells CP; 6: 100 passages of CBS; 7: 100 passages of cells CP. (C) Biotransformation of co-expressed recombinant strain.

酶的催化效率而影响 D-甘露醇的合成。按照方法 1.2.2 诱导表达 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*, 离心收集菌体, 进行全细胞转化合成 D-甘露醇。控制菌体  $OD_{600}$  为 30, D-果糖

浓度为 100 g/L, 辅底物葡萄糖与底物 1 : 1 摩尔当量, 初始 pH 控制在 6.5, 在 25 °C、30 °C、35 °C、40 °C、45 °C 不同温度下进行全细胞转化。结果如图 9A 所示, 在反应温度为 30 °C 时,

果糖的转化率最高,为 89.2%,D-甘露醇产量为 65.4 g/L。随着温度上升到 45 ℃,D-甘露醇的产量显著下降,说明随着温度的上升参与反应的酶的酶活受到影响,反应效率下降。

#### 2.4.2 pH 对全细胞转化合成 D-甘露醇的影响

在多酶催化体系中,pH 通过影响到不同酶的解离状态而影响到多酶的协同催化效率。例如 *LpMDH* 的最适 pH 为 6.5, *BaGDH* 的最适 pH 为 7.0,为了使反应高效进行,对反应体系 pH 进行了优化。按照方法 1.2.2 诱导表达重组大肠杆菌,离心收集菌体,进行全细胞转化合成 D-甘露醇,理论上在转化过程中由于葡萄糖转化为葡萄糖酸使得体系的 pH 不断下降,所以需要全程控制 pH。控制菌体  $OD_{600}$  为 30, D-果糖浓度 100 g/L,辅底物葡萄糖与底物 1:1 摩尔当量,反应温度 30 ℃,初始 pH 分别控制在 5.0、6.0、6.5、7.0、8.0、9.0 和 10.0,进行全细胞转化。

结果如图 9B 所示,碱性条件不利于 D-甘露醇的合成,在弱酸的条件下,酶表现出很强的催化性能,在 pH 为 6.0–7.0 时,D-甘露醇的产量较高,其中 pH 为 6.5 时最高,为 69.1 g/L。

#### 2.4.3 菌体量对全细胞转化合成 D-甘露醇的影响

在实际应用和工业生产中,控制反应过程中的菌体量能有效提高产率和降低成本。按照方法 1.2.2 诱导表达 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*,离心收集菌体,进行全细胞转化合成 D-甘露醇。控制初始 pH 为 6.5,反应温度 30 ℃,D-果糖浓度 100 g/L,辅底物葡萄糖与底物 1:1 摩尔当量,菌体  $OD_{600}$  为 10、20、30、40、50 和 60 不同菌体量的条件下进行全细胞转化。结果如图 9C 所示,在菌体  $OD_{600}$  为 30 时,D-甘露醇的产量最高,为 71.3 g/L。

#### 2.4.4 辅底物浓度对全细胞转化合成 D-甘露醇的影响

在全细胞转化中,适当的底物浓度能够促进产物的合成,辅底物葡萄糖在 *BaGDH* 作用下生成辅因子 NADH,通过提供充足的辅因子 NADH,重组菌合成的 D-甘露醇产量不断提高,所以需要对底物 D-果糖和辅底物葡萄糖的添加量进行优化。按照方法 1.2.2 诱导表达重组菌株 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*,离心收集菌体,进行全细胞转化合成 D-甘露醇。控制初始 pH 为 6.5,反应温度 30 ℃,菌体  $OD_{600}$  为 30, D-果糖浓度 100 g/L,分别添加 0、0.5、1.0、2.0、2.5 和 3.0 倍摩尔当量葡萄糖进行全细胞转化。

如图 9D 所示,未添加葡萄糖时,能少量的合成 D-甘露醇,这是由于大肠杆菌本身能产生少量 NADH,但不能给整个反应体系提供充足的辅酶。随着葡萄糖添加量的增加,D-甘露醇的转化率不断增加。当葡萄糖添加量为 2.0、2.5 和 3.0 倍摩尔当量时,D-甘露醇产量稍有下降,表明当辅底物添加量  $\geq 1$  倍摩尔当量时就可以满足反应的需求,添加过多反而影响到产物的合成。在葡萄糖添加量为 1 倍摩尔当量时,D-甘露醇的产量最高,为 78.1 g/L。

#### 2.5 5 L 发酵罐水平全细胞转化合成 D-甘露醇

为了提高重组大肠杆菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* 的转化能力,放大转化体系,按照上述全细胞转化优化条件,利用 5 L 发酵罐高效转化果糖合成 D-甘露醇。用 50 mmol/L 的 PB 缓冲液悬浮 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* 菌体,控制初始菌体量  $OD_{600}$  为 30,将其与 100.0 g/L D-果糖、100.0 g/L 葡萄糖溶液定容至 1 L,于 5 L

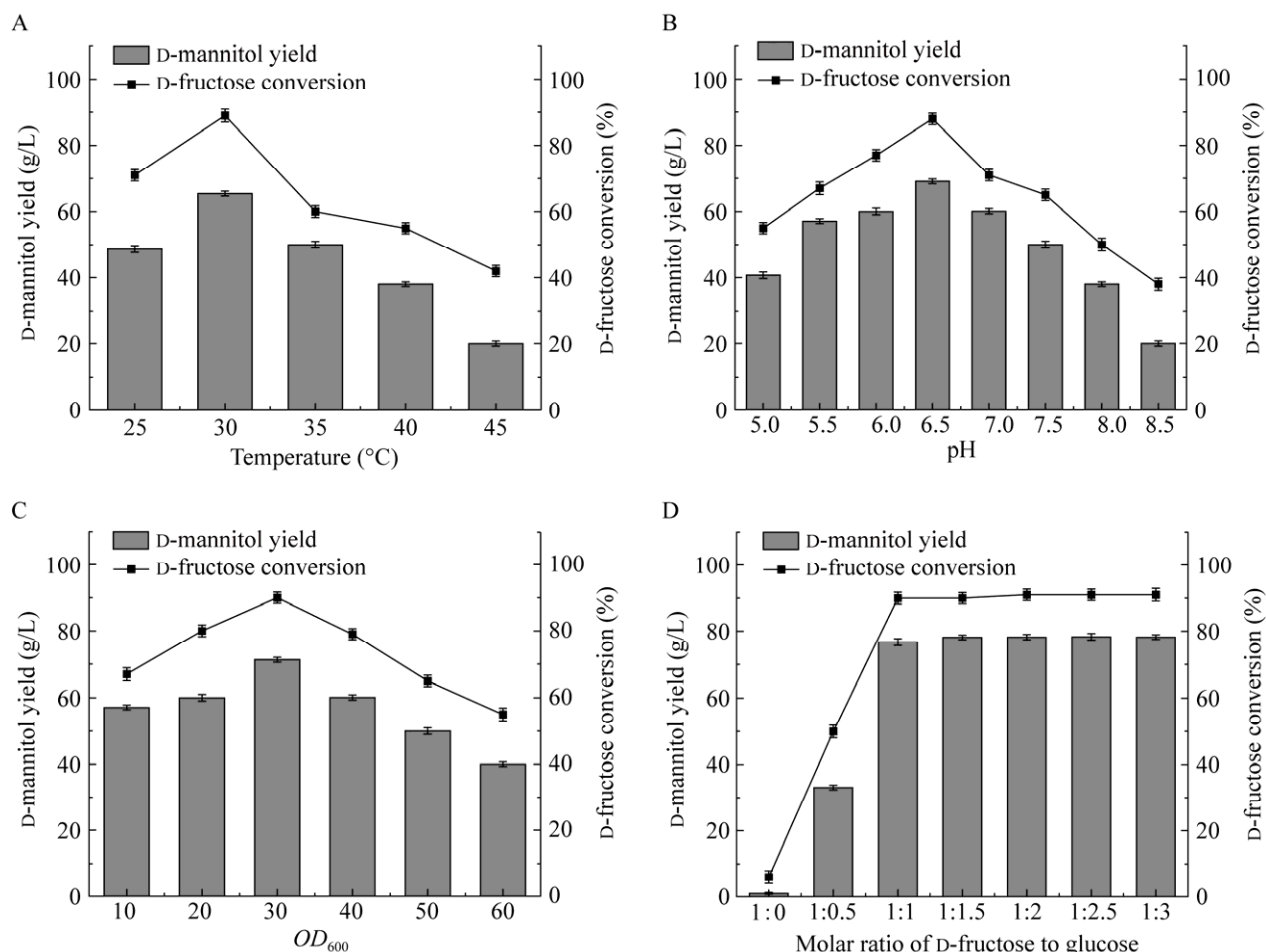


图 9 温度 (A)、pH (B)、菌体密度 (C) 及底物浓度 (D) 对重组菌 *E. coli* BL21 pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* 全细胞转化合成 D-甘露醇的影响

Figure 9 Influence of temperature (A), pH (B), cell density (C) and substrate concentration (D) on the transformation of D-mannitol using whole-cells of recombinant *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh*.

发酵罐中进行转化, 转化温度为 30 °C、pH 6.5。HPLC 检测转化液中各组分含量, 结果见图 10。转化 12 h, 果糖浓度为 17.3 g/L, 生成 D-甘露醇 70.5 g/L; 转化 24 h, 果糖葡萄糖消耗速度减缓, 转化液中 D-甘露醇的积累量达 81.9 g/L; 转化 24 h 后, 葡萄糖和果糖被完全消耗, D-甘露醇产量趋于稳定。以上结果表明, 反应前期产物合成速率很快, 在 24 h 时达到最高值; 后期延长反应时间, 产物产量并没得到提高, 出

现以上情况的原因是酶的活性降低以及全细胞催化反应趋于平衡。

### 3 讨论与结论

本研究通过双酶级联协调表达策略, 利用大肠杆菌全细胞催化 D-果糖高效合成 D-甘露醇。首先从关键酶入手, 筛选获得了具有 pH 稳定性好和 D-果糖转化能力强的假肠膜明串珠菌来源的甘露醇脱氢酶 *LpMDH*; 接着比较不同



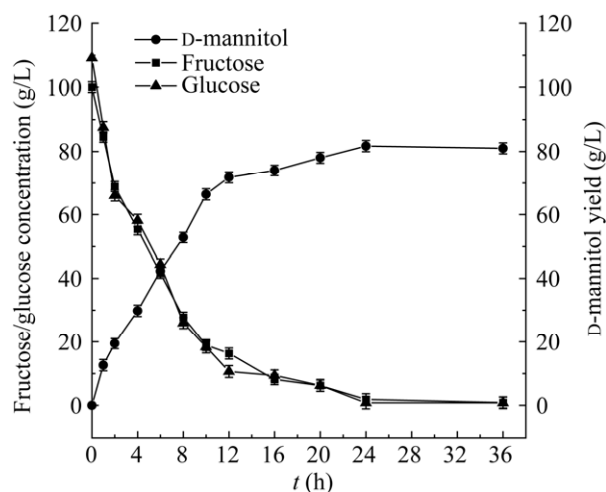


图 10 重组菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* 在 5 L 发酵罐全细胞转化合成 D-甘露醇

Figure 10 D-Mannitol synthesis using whole-cells of recombinant *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* in a 5 L fermenter.

辅酶再生体系催化效率筛选获得解淀粉芽孢杆菌来源的葡萄糖脱氢酶 *BaGDH* 用于辅酶 NADH 循环再生。将 *LpMDH* 和 *BaGDH* 粗酶液按照不同比例添加到体外反应体系中, 初步测试 D-甘露醇转化能力, 确定 *BaGDH* 与 *LpMDH* 最佳添加量比为 4:1 时, 转化率最高达 82.1%。然后将 *LpMDH* 和 *BaGDH* 在大肠杆菌中进行串联表达构建单细胞工厂实现 D-果糖到 D-甘露醇的全细胞转化, D-甘露醇的摩尔转化率为 59.7%。为解决全细胞催化体系效率低的问题, 根据体外酶量最佳适配比, 通过增加 *Bagdh* 的拷贝量提高辅酶再生能力、平衡双酶催化速率从而实现 D-甘露醇的高效转化, D-甘露醇的摩尔转化率提高至 70.5%。最后从温度、pH、菌体量和辅底物浓度 4 个方面优化全细胞催化体系, 确定最适条件为反应温度 30 °C, 初始 pH 值 6.5, 菌体量  $OD_{600}=30$ , 底物 D-果糖浓度 100.0 g/L 以及辅底物葡萄糖与底物的比例为

1:1 摩尔当量。最终的工程菌 *E. coli* BL21/pETDuet-*Lpmdh-Bagdh-Bagdh* 在 5 L 发酵罐中于最适反应条件下转化 24 h, D-甘露醇的最高产量为 81.9 g/L, 摩尔转化率为 81.9%, 达到国内领先水平。目前, 国内陈艳等<sup>[30]</sup>以蔗糖为底物利用重组大肠杆菌发酵合成甘露醇, 发酵 10 h, D-甘露醇产量达 45.2 g/L, 总糖转化率为 37.7%; 罗希等<sup>[31]</sup>利用大肠杆菌以菊粉为底物全细胞催化生产甘露醇, 转化 48 h D-甘露醇的产率可达到 0.93 g/g, 反应体系较小。本研究一定程度上解决了 D-甘露醇全细胞催化反应过程中关键酶和辅酶无法协调表达的问题, 提高了辅因子循环能力, 放大转化体系后实现了 D-甘露醇的高效合成。为工业化生产 D-甘露醇提供了更加绿色、高效的方法。

## REFERENCES

- [1] El-Nakkady SS, Hanna MM, Roaiah HM, et al. Synthesis, molecular docking study and antitumor activity of novel 2-phenylindole derivatives. *Eur J Med Chem*, 2012, 47(1): 387-398.
- [2] Ranta K, Nieminen K, Ekholm FS, et al. Evaluation of immunostimulatory activities of synthetic mannose-containing structures mimicking the  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-linked cell wall mannans of *Candida albicans*. *Clin Vaccine Immunol*, 2012, 19(11): 1889-1893.
- [3] Koko MYF, Hassanin HAM, Letsididi R, et al. Characterization of a thermostable mannitol dehydrogenase from hyperthermophilic *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 with potential application in mannitol production. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 134: 122-128.
- [4] Saha BC, Racine FM. Biotechnological production of mannitol and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(4): 879-891.
- [5] Mooradian AD, Smith M, Tokuda M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: a narrative review. *Clin Nutr ESPEN*, 2017, 18: 1-8.

- [6] Martău GA, Coman V, Vodnar DC. Recent advances in the biotechnological production of erythritol and mannitol. *Crit Rev Biotechnol*, 2020, 40(5): 608-622.
- [7] Koko MYF, Mu WM, Hassanin HAM, et al. Archaeal hyperthermostable mannitol dehydrogenases: a promising industrial enzymes for D-mannitol synthesis. *Food Res Int*, 2020, 137: 109638.
- [8] Patra F, Tomar SK, Arora S. Technological and functional applications of low-calorie sweeteners from lactic acid bacteria. *J Food Sci*, 2009, 74(1): R16-R23.
- [9] André P, Villain F. Free radical scavenging properties of mannitol and its role as a constituent of hyaluronic acid fillers: a literature review. *Int J Cosmet Sci*, 2017, 39(4): 355-360.
- [10] Takkar B, Sharma P, Gaur N, et al. Proparacaine-induced mydriasis during strabismus surgery. *Semin Ophthalmol*, 2018, 33(3): 367-370.
- [11] Dai YW, Meng Q, Mu WM, et al. Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol. *J Funct Foods*, 2017, 36: 404-409.
- [12] 陈莉, 王洁, 陈继承, 等. 响应面优化超声辅助酸解醇提海带甘露醇工艺研究. *食品工业*, 2017, 38(3): 1-4.  
Chen L, Wang J, Chen JC, et al. Optimization of ultrasonic-assisted ethanol extraction of mannitol after acidolysis from *Laminaria Japonica* by response surface methodology. *Food Ind*, 2017, 38(3): 1-4 (in Chinese).
- [13] Bhatt SM, Mohan A, Srivastava SK. Challenges in enzymatic route of mannitol production. *ISRN Biotechnol*, 2013, 2013: 914187.
- [14] 胡梦莹, 张涛. 微生物发酵转化甘露醇的研究进展. *食品与发酵工业*, 2020, 46(18): 245-251.  
Hu MY, Zhang T. Research progress on mannitol production by microbial fermentation. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(18): 245-251 (in Chinese).
- [15] Savergave LS, Gadre RV, Vaidya BK, et al. Two-stage fermentation process for enhanced mannitol production using *Candida magnoliae* mutant R9. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2013, 36(2): 193-203.
- [16] Papagianni M, Legiša M. Increased mannitol production in *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 production strain with a modified 6-phosphofructo-kinase. *J Biotechnol*, 2014, 181: 20-26.
- [17] Zhang M, Gu L, Cheng C, et al. Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies. *World J Microbiol Biotechnol*, 2018, 34(3): 41.
- [18] Saha BC, Racine FM. Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 553-560.
- [19] Beauchamp JL, Worden RM, Vieille C. Modelling mannitol dehydrogenase for development of a thermostable bioelectronic interface. *Meet Abstr*, 2010(1): 5.
- [20] Bhatt SM, Mohan A, Srivastava SK. Challenges in enzymatic route of mannitol production. *ISRN Biotechnol*, 2013, 2013: 914187.
- [21] Kaup B, Bringer-Meyer S, Sahm H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(3): 333-339.
- [22] Bäumchen C, Bringer-Meyer S. Expression of *glf\_Z.m.* increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(3): 545-552.
- [23] Zhang Z, Cheng WY, Ju XY, et al. The effect of dextransucrase gene inactivation on mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Indian J Microbiol*, 2015, 55(1): 35-40.
- [24] 逯付之, 徐伟, 吴昊, 等. 来源于 *P. bacterium* 1109 的甘露醇脱氢酶的重组纯化及酶学性质研究. *食品工业科技*, 2020, 41(19): 137-143, 165.  
Lu FZ, Xu W, Wu H, et al. Purification and characterization of recombinant mannitol dehydrogenase from *P. bacterium* 1109. *Sci Technol Food Ind*, 2020, 41(19): 137-143, 165 (in Chinese).
- [25] Vazquez-Figueroa E, Yeh V, Broering JM, et al. Thermostable variants constructed via the structure-guided consensus method also show increased stability in salts solutions and homogeneous aqueous-organic media. *Protein Eng Des Sel*, 2008, 21(11): 673-680.
- [26] 陈佳杰, 徐美娟, 杨套伟, 等. 亮氨酸脱氢酶 C 端 Loop 区域的理性设计及多酶级联高效合成 L-2-氨基丁酸. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4254-4265.  
Chen JJ, Xu MJ, Yang TW, et al. Rational design of the



- C-terminal loop region of leucine dehydrogenase and cascade biosynthesis L-2-aminobutyric acid. *Chin J Biotech*, 2021, 37(12): 4254-4265 (in Chinese).
- [27] Li XF, Jiang B, Pan BL, et al. Purification and partial characterization of *Lactobacillus* species SK007 lactate dehydrogenase (LDH) catalyzing phenylpyruvic acid (PPA) conversion into phenyllactic acid (PLA). *J Agric Food Chem*, 2008, 56(7): 2392-2399.
- [28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [29] Howaldt M, Gottlob A, Kulbe and KD, et al. Simultaneous conversion of glucose/fructose mixtures in a membrane reactor. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 542(1): 400-404.
- [30] 陈艳, 田康明, 李玉, 等. 以蔗糖为底物利用重组大肠杆菌合成甘露醇. *微生物学通报*, 2014, 41(11): 2182-2190.
- Chen Y, Tian KM, Li Y, et al. Mannitol biotransformation from sucrose with recombinant *Escherichia coli*. *Microbiol China*, 2014, 41(11): 2182-2190 (in Chinese).
- [31] 罗希, 曹海龙, 张卉妍, 等. 以菊粉为底物全细胞催化生产甘露醇. *大连工业大学学报*, 2017, 36(4): 235-239.
- Luo X, Cao HL, Zhang HY, et al. The whole cell catalytic production of mannitol using inulin as substrate. *J Dalian Polytech Univ*, 2017, 36(4): 235-239 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)