摘 要

D-阿洛酮糖作为一种稀有酮糖，具有抗肥胖、调节血脂代谢等多重生理功能，在食品、药品、化妆品等领域中具有良好的应用价值。目前生物法合成 D-阿洛酮糖主要通过酮糖 3-差相异构酶转化 D-果糖实现，然而受限于反应的化学平衡和酮糖 3-差向异构酶较差的耐热性，D-阿洛酮糖的大规模工业生产仍面临较大挑战，因此，迫切需要开发新颖、高效的 D-阿洛酮糖合成方法。本课题基于聚磷酸葡萄糖激酶（Glucokinase polyphosphate，PPGK）、葡萄糖 6-磷酸异构酶（Glucose 6-phosphate isomerase，PGI）、D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差向异构酶（D-allulose 6-phosphate 3-epimerase，A6PE）和 D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶（D-allulose 6-phosphate phosphatase，A6PP）的催化特性，设计了一种多酶级联催化体系，实现“一釜四酶法”转化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖；此外以冷却结晶法制备 D-阿洛酮糖晶体并进行了工艺优化，为工业生产 D-阿洛酮糖产品提供理论支持。本论文的主要研究内容如下：

首先，基于多酶级联催化原则，设计了一条催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖的级联催化路线，经磷酸化、异构化、差相异构化和去磷酸化级联反应实现酮糖的转化；探究重组酶的酶学性质，明确了多酶级联体系中各酶的适配性。研究表明：四种重组酶均能在大肠杆菌中实现异源表达；重组 A6PP 的最适反应温度为 60℃，最适 pH 为 7.0，最适金属离子为 Mg^{2+}，且该酶对 D-阿洛酮糖 6-磷酸的亲和力最强，通过分子对接预测了重组 A6PP 底物催化模型及关键氨基酸残基位点；同样考察了体系中其他重组酶的最适温度、pH 及金属离子依赖性，结果表明各酶在所构建的体系中均能兼容。

其次，构建了基于多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖的体系；探究了级联反应温度、pH、酶负载量比例、六偏磷酸钠浓度和 $MgCl_2$ 浓度的影响，优化了多酶级联反应体系；并探讨了扩大反应体系对合成 D-阿洛酮糖的影响。结果表明：本研究设计的多酶级联体系能成功应用于 D-阿洛酮糖的合成；以 10.0 mmol/L D-葡萄糖为底物，最优反应条件如下：最适反应温度、pH 分别为 60℃和 7.0，最优 PPGK、PGI、A6PE、A6PP 负载量比例为 1.5: 1.2: 0.8: 0.8，最优六偏磷酸钠、$MgCl_2$ 浓度分别为 2.0 和 6.0 mmol/L，优化条件后 D-阿洛酮糖产率可达到 41.20%±1.40%；扩大反应体系后以 200.0 mmol/L D-葡萄糖为底物合成 D-阿洛酮糖，在反应 6~8 h 后体系中 D-阿洛酮糖的浓度最高达到 80.20±3.20 mmol/L。

最后，探讨了不同因素对 D-阿洛酮糖冷却结晶的影响以优化结晶工艺；并对制备的 D-阿洛酮糖结晶产品进行了性质表征。结果表明：在料液浓度为 1.4 g/mL，结晶终点温度为 20~25℃，降温速率为 2.0℃/h，以及搅拌速率为 20 r/min 的最优条件下，结晶率回收率为 77.43%±2.50%，纯度为 98.70%±0.05%；晶体表征结果说明结晶产品具有较好的热稳定性，晶体属于正交晶系 $P2_12_12_1$ 空间群，基本形貌为斜方晶型。

关键词：D-阿洛酮糖；多酶催化；D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶；冷却结晶

Abstract

D-allulose (also known as D-psicose) is a rare sugar with multiple physiological functions such as anti-obesity and regulation of blood lipid metabolism, which provides beneficial applications in food, pharmaceuticals, and cosmetics. Currently, the bio-production of D-allulose has achieved mainly through the conversion of D-fructose by ketose 3-epimerase. However, the chemical equilibrium of the reversible reaction and the weak thermostability of ketose 3-epimerase still posed major challenges in the large-scale industrial production of D-allulose. Hence, there is a necessary requirement to explore novel and effective approaches to the synthesis of D-allulose. A multi-enzyme cascade catalytic system to synthesize D-allulose from D-glucose in a "One-Pot" was constructed, containing Glucokinase polyphosphate (PPGK), Glucose 6-phosphate isomerase (PGI), D-allulose 6-phosphate 3-epimerase (A6PE), and D-allulose 6-phosphate phosphatase (A6PP) based on their catalytic properties. In addition, the processes for the preparation of D-allulose by cooling crystallization method were optimized to provide theoretical support for the industrial production of D-allulose products. The main research contents of this thesis are as follows:

Firstly, based on the principle of multi-enzyme cascade system, a cascade catalytic route was designed to biosynthesis of D-allulose from D-glucose via phosphorylation, isomerization, epimerization, and dephosphorylation reaction. Furthermore, the enzymatic properties of recombinant enzymes were explored to clarify the suitability in the multi-enzyme cascade system. The results indicated that all recombinant enzymes could achieve heterologous expression in *E. coli*. The optimum temperature, pH, and metal ion of recombinant A6PP was 60°C, 7.0 and Mg^{2+} respectively, and it showed the strongest affinity for D-allulose 6-phosphate as substrate. The substrate catalytic model and key amino acid residue sites has also been predicted through molecular docking in this study. Moreover, the optimal temperature, pH, and metal ion dependence of the other recombinant enzymes in the system were also investigated and the results showed that all enzymes were compatible in designed system.

Secondly, it was constructed a multi-enzyme cascade system for synthesis of D-allulose from D-glucose. The reaction conditions of the cascade system were optimized through investigating the effects of rection temperature, pH, enzyme loading ratios, sodium hexametaphosphate and $MgCl_2$ concentration, respectively. Furthermore, the impact of amplification reaction system on the synthesis of D-allulose was also discussed. The results showed that the multi-enzyme cascade system constructed in this study can be successfully applied to the synthesis of D-allulose. The optimal production conditions with 10.0 mmol/L D-glucose as the substrate were as follows: the optimal temperature and pH were 60°C and 7.0, the optimal recombinant PPGK, PGI, A6PE and A6PP loading ratios were 1.5: 1.2: 0.8: 0.8, and the optimal sodium hexametaphosphate concentration and $MgCl_2$ concentration were 2.0 and 6.0 mmol/L, respectively. Under optimized conditions, the yield of D-allulose could reach 41.20% ± 1.40%. The reaction system was expanded to synthesis D-allulose using 200.0 mmol/L D-glucose as the substrate and the concentration of D-allulose in the system reached a maximum of 80.20 ± 3.20 mmol/L after 6~8 h reaction.

Finally, the effect of different factors on the cooling crystallization of D-allulose was investigated to optimize the crystallization processes; the properties of the prepared crystal products were also characterized. The results showed that under the optimal conditions of 1.4 g/mL liquid concentration, 20~25°C final temperature, 2.0°C/h cooling rate and 20 r/min stirring rate, the crystallization yield recovery was 77.43% ± 2.50% and the purity was 98.70% ± 0.05%. The characterization results indicated that the crystal products had superior thermal stability and that the crystals belonged to the orthogonal crystal system $P2_12_12_1$ space group.

Keywords: D-allulose, multi-enzyme catalysis, D-allulose 6-phosphate phosphatase, cooling crystallization

缩写符号说明

缩略词	英文全称	中文全称
PPGK	Glucokinase polyphosphate	聚磷酸葡萄糖激酶
PGI	Glucose 6-phosphate isomerase	葡萄糖 6-磷酸异构酶
A6PE	D-allulose 6-phosphate 3-epimerase	D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差向异构酶
A6PP	D-allulose 6-phosphate phosphatase	D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶
G6P	Glucose 6-phosphate	葡萄糖 6-磷酸
G1P	Glucose 1-phosphate	葡萄糖 1-磷酸
F6P	Fructose 6-phosphate	果糖 6-磷酸
A6P	D-allulose 6-phosphate	D-阿洛酮糖 6-磷酸
KEase	Ketose 3-epimerase	酮糖 3-差相异构酶
DPEase	D-psicose 3-epimerase	D-阿洛酮糖 3-差向异构酶
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kana	Kanamycin	卡那霉素
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalactoside	异丙基-β-D-硫代半乳糖
E. coli	*Escherichia coli*	大肠杆菌
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色谱
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振波谱
LB	Lysogeny broth	溶源性肉汤
kDa	Kilodalton	千道尔顿
OD	Optical density	吸光度值
bp	Base pair	碱基对
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
XRD	X-ray diffraction	X-射线粉末衍射
DSC	Differential scanning calorimetry	差示扫描量热法
TGA	Thermogravimetric analysis	热重分析

目　录

第一章 绪论.....1
1.1 D-阿洛酮糖的研究概述.....1
1.1.1 D-阿洛酮糖生理功能.....2
1.1.2 D-阿洛酮糖的应用.....4
1.2 生物法制备 D-阿洛酮糖的研究概述.....4
1.2.1 单酶法合成 D-阿洛酮糖.....4
1.2.2 多酶法合成 D-阿洛酮糖.....5
1.3 D-阿洛酮糖结晶工艺的研究概述.....8
1.4 课题研究意义及内容.....9
1.4.1 研究意义.....9
1.4.2 主要研究内容.....10
第二章 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的异源表达及酶学性质研究.....11
2.1 引言.....11
2.2 实验材料与试剂.....11
2.2.1 菌株及质粒.....11
2.2.2 材料、试剂与试剂盒.....12
2.2.3 仪器与设备.....12
2.2.4 主要试剂的配制.....12
2.3 实验方法.....13
2.3.1 重组质粒的构建.....13
2.3.2 重组菌的构建.....13
2.3.3 重组蛋白的诱导表达.....14
2.3.4 重组蛋白的纯化及验证.....14
2.3.5 酶活力测定方法.....14
2.3.6 重组 A6PP 酶学性质研究.....16
2.3.7 重组酶适配性研究.....17
2.3.8 实验数据分析软件.....17
2.4 结果与讨论.....18
2.4.1 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系的设计.....18
2.4.2 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的选择.....19
2.4.3 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的异源表达及纯化.....20
2.4.4 重组 A6PP 酶学性质分析.....21

2.4.5 重组酶适配性分析.....26
2.5 本章小结.....27
第三章 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系构建及反应优化研究.....28
3.1 引言.....28
3.2 实验材料与试剂.....28
3.2.1 菌株及质粒.....28
3.2.2 材料、试剂与试剂盒.....28
3.2.3 仪器与设备.....28
3.3 实验方法.....28
3.3.1 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系的构建.....28
3.3.2 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖反应条件的优化 29
3.3.3 扩大反应体系合成 D-阿洛酮糖 29
3.3.4 反应产物分析.....30
3.3.5 实验数据分析软件.....30
3.4 结果与讨论.....31
3.4.1 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系的可行性验证.....31
3.4.2 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖反应条件优化分析.....34
3.4.3 最优条件下多酶级联催化合成 D-阿洛酮糖 38
3.4.4 扩大反应体系合成 D-阿洛酮糖 39
3.5 本章小结.....40
第四章 冷却结晶法制备 D-阿洛酮糖工艺研究.....41
4.1 引言.....41
4.2 实验材料与试剂.....41
4.2.1 材料与试剂.....41
4.2.2 仪器设备.....41
4.3 实验方法.....41
4.3.1 冷却结晶法制备 D-阿洛酮糖工艺的探究 41
4.3.2 D-阿洛酮糖晶体分析表征 43
4.3.3 实验数据分析软件.....43
4.4 实验结果与讨论.....43
4.4.1 D-阿洛酮糖冷却结晶工艺的优化 43
4.4.2 D-阿洛酮糖冷却结晶工艺小结 46
4.4.3 D-阿洛酮糖冷却结晶产品表征结果分析 47
4.5 本章小结.....49
主要结论与展望 50

主要结论.....50
展望.....51
参考文献.....52

第一章 绪论

1.1 D-阿洛酮糖的研究概述

近年来，由于膳食能量摄入过多（高糖与高脂的饮食偏好），例如糖尿病、高血压、肥胖等慢性病的发生率在全球范围内迅速增加，对人类的身体健康构成了严重的威胁[1,2]。寻找低热量的、具有一定功能性的食品补充剂是解决此问题极具吸引力的策略。因此，低热量和功能性的稀有糖在食品与药品中的研究越来越引人注目[3]。D-阿洛酮糖（D-allulose 或称 D-psicose）是一种典型的具有多重功能的稀有酮糖，它是 D-果糖的 C-3-差向异构体化合物，具有蔗糖 70%的相对甜度，但仅为蔗糖能量的 0.3%，因而被认为是蔗糖的良好替代物[4]。表 1-1 列举出了 D-阿洛酮糖具体的理化性质。

表 1-1 D-阿洛酮糖的理化性质

Table 1-1 Physical and chemical properties of D-allulose

化学性质	描述
分子式	$C_6H_{12}O_6$
CAS 号	No.551-68-8
分子质量（g/mol）	180.156
物理状态	白色固体结晶粉末
构象	1C（$^1C_4$(D)）[5]
气味	/
旋光度	$[\alpha]^{20}$/D = -85°（c=1, H_2O）
溶解度	291 g /100 g 水
甜度（相对于蔗糖）	70%
能量（kcal/g）	0.4

L-阿洛酮糖则是 D-阿洛酮糖的镜像异构体[6]，两种物质的构象见图 1-1。D-阿洛酮糖作为一种还原糖，添加到食品中可通过调节美拉德反应对含蛋清蛋白食品的性质如凝胶强度、乳化稳定性、起泡性、抗氧化性等进行综合改善，提高食品品质[7-9]。美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）于 2019 年公布，“添加糖”和“总糖”的标签上不再标注 D-阿洛酮糖[10]。北美食品饮料新品开始大量使用 D-阿洛酮糖，市场需求急剧增加，目前中国、日本以及部分欧盟国家也在积极申请将 D-阿洛酮糖列为食品原料。然而，D-阿洛酮糖在自然界中存在量极少，仅微量地存在于小麦、鼠刺属植物、加工后的甘蔗、甜菜糖浆以及果葡糖浆中[11]，因此仅靠从天然物质中提取 D-阿洛酮糖无法满足当下研究及生产需求，需要借助化学或生物等方法人工合成 D-阿洛酮糖以提高 D-阿洛酮糖的产能。

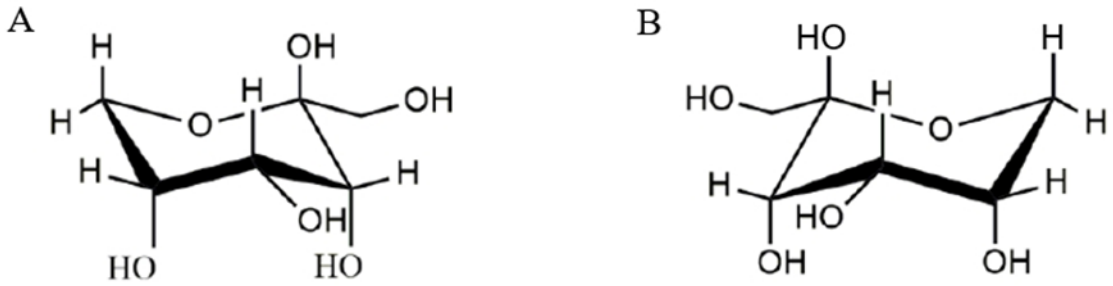

图 1-1 D-阿洛酮糖的构象图（A）和 L-阿洛酮糖的构象图（B）

Figure 1-1 The conformation of D-allulose (A) and the conformation of L-allulose (B)

1.1.1 D-阿洛酮糖生理功能

D-阿洛酮糖被 FDA 认证为“一般安全”（generally recognized as safe，GRAS），并被允许用作各种食品和膳食补充剂的成分。当人体摄入 D-阿洛酮糖时，70%在小肠中被吸收，由肠道细菌进行少量发酵，其余的 30% D-阿洛酮糖会随粪便排出，被吸收的 D-阿洛糖也不会被代谢，而是通过尿液排出[12-14]。在血糖水平正常的健康受试者中，每天三餐随餐摄入 5 g D-阿洛酮糖长达 12 周没有引起任何肝功能病变[15]，其在大鼠体内的 LD_{50} 值被评估为 16 g/kg 体重[16]，研究表明其对大鼠不具有生殖毒性[17]，D-阿洛酮糖在人类胃肠道环境中的最大无效浓度估计为 0.55 g/kg 体重[16]。D-阿洛酮糖也被证明对人体健康有抗肥胖、降低血糖水平、调节血脂代谢以及防治龋齿等多重生理功能[18-20]。图 1-2 列举了已报道的 D-阿洛酮糖的生理功能。

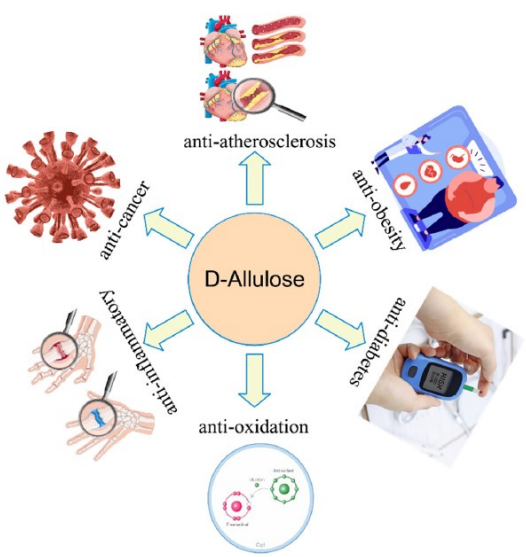

图 1-2 D-阿洛酮糖的多重生理功能[21]

Figure 1-2 Multiple physiological functions of D-allulose[21]

1.1.1.1 抗肥胖

D-阿洛酮糖具有抗肥胖功能，用含 3% D-阿洛酮糖的饲料喂养大鼠 18 个月，大鼠的体重和腹部脂肪组织的增长均显著低于用相同蔗糖水平饲料喂养的对照组大鼠[22]。

其可能的作用机制是 D-阿洛酮糖通过抑制脂肪酸合成相关酶的活性或增加能量消耗来减少大鼠腹部脂肪堆积，增强餐后脂肪氧化，减轻体重[23]。同时它对预防高脂肪饮食（High fat diet，HFD）引起的肥胖症、肝脂肪变性和血脂异常非常有效[24]，能降低高脂饮食诱导的肥胖大鼠内脏脂肪质量，通过改变脂质调节酶的活性及其基因表达水平，使由节食引起的肥胖症的代谢状况正常化[25]。Choi 等[26]比较了 D-阿洛酮糖与两种益生菌对饮食诱导肥胖（Diet-induced obese，DIO）小鼠的影响，发现含有 D-阿洛酮糖的共生混合物对抑制 DIO 更有效。Itoh 等[27]人发现膳食补充 D-阿洛酮糖能有效影响餐后高血糖水平，并改善和肥胖相关的肝脏脂肪变性。

1.1.1.2 降低血糖

Hossian 等[28]人研究发现长期服用含 D-阿洛酮糖的糖浆可诱导肝脏葡萄糖激酶由细胞核向细胞质转运，维持大鼠糖耐量和胰岛素敏感性，保护胰岛细胞以改善胰岛素抵抗，从而维持大鼠的血糖水平。D-阿洛酮糖作为小肠中葡萄糖转运蛋白 5（Glucose transporter 5，GLUT5）和葡萄糖转运蛋白 2（Glucose transporter 2，GLUT2）的底物，分别通过葡萄糖转运蛋白 GLUT5 和 GLUT2 进入和离开肠道小肠细胞，其长期作用集中在预防糖尿病大鼠中II型糖尿病的发生和发展。它能降低健康受试者和边缘性糖尿病受试者的餐后血糖水平[3]。此外，D-阿洛酮糖对小肠中的蔗糖酶、麦芽糖酶也有一定抑制作用，研究人员发现 D-阿洛酮糖调节的代谢物参与脂肪酸 β-氧化、胆固醇和胆汁酸的代谢途径，通过调节脂质和葡萄糖代谢来调节餐后血糖水平，改善胰岛素抵抗[25,29]。此外 D-阿洛酮糖还能改善在糖尿病前期大鼠的代谢紊乱和认知功能下降[30]。

1.1.1.3 调节血脂代谢

D-阿洛酮糖具有改变葡萄糖醛酸/木糖代谢途径的可能性[19]，还可抑制单核细胞趋化蛋白-1 的表达，降低血清中前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶水平[31]，并通过 B 族I类清道夫受体（Scavenger receptor class B type 1，SR-B_1）增强肝脏高密度脂蛋白胆固醇（High density lipoprotein cholesterol，HDL-C）摄取，起到针对动脉粥样硬化的治疗效果[25]。Kim 等[22]发现将 D-阿洛酮糖作为膳食补充剂的小鼠的体重、脂肪细胞大小以及脂肪合成相关基因的表达量均有所下降。它还能有效预防 HFD 诱导的肥胖、肝脂肪变性和血脂异常，并显著减少 HFD 诱导的肥胖大鼠的内脏脂肪量[32,33]。因此上述研究表明 D-阿洛酮糖能调节血脂代谢，降低动脉粥样硬化风险，可以用作预防和改善肥胖和肥胖相关疾病的补充剂。

1.1.1.4 其他功能

D-阿洛酮糖还能够与肠道微生物密切相互作用，以减轻炎症症状，原因可能是通过下调 Gm12250 基因在多个组织中的表达，从而增加了肠道微生物组成中的乳酸菌[34]。相较于其他的稀有酮糖，D-阿洛酮糖能更好地清除活性氧自由基，减少活性氧自由基的生成[35]，并可对抗 6-羟多巴胺所致的 PC12 细胞凋亡[36]，通过提高细胞内谷胱甘肽水平在神经退行性疾病的治疗中发挥潜在的神经保护的作用[37]。还有研究表明 D-阿洛酮

糖在单氧或无氧培养条件下，均可通过饮食限制机制，增强秀丽隐杆线虫对氧化应激的抗性，延长该线虫寿命[38]，这些结果表明 D-阿洛酮糖可以作为一种良好的膳食限制模拟药物。

1.1.2 D-阿洛酮糖的应用

D-阿洛酮糖具有还原性和高褐变反应性[39]，因此在食品工业中有广泛应用，特别适合于生产烘焙食品、调味酱、番茄酱、糖果和饮料等产品。D-阿洛酮糖代替蔗糖在松饼[40]、软糖[41]、枣汁[42]、磅蛋糕[43]等食品加工中的应用已被研究报道。与蔗糖相比，D-阿洛酮糖的存在对大豆凝胶（由大豆分离蛋白与 D-阿洛酮糖配制而成）的消化行为有显著影响，可用于设计低热量、能促进饱腹感的糖果产品[44,45]。Sun 等[46]将 D-阿洛酮糖代替蔗糖，添加到食品原料中，可有效提高产品的抗氧化活性。D-阿洛酮糖相比于蔗糖或山梨糖醇，能更有效提高热诱导鱼糜凝胶的凝胶强度和保水性。肌纤维蛋白之间通过巯基残基形成的二硫键和非二硫键影响阿洛酮糖凝胶的力学性能，改善热诱导鱼糜凝胶的保水性[47]。

利用 D-阿洛酮糖与蛋白的美拉德反应制成的功能性食品和特医食品可防治龋齿，II型糖尿病以及由氧化应激导致的相关疾病等。此外还有研究显示牛奶中几种乳酸菌的生长会受到 D-阿洛酮糖的影响，可用于调节过度发酵牛奶中的产酸[48]，揭示着 D-阿洛酮糖可能在乳制品的生产中发挥重要作用。由于 D-阿洛酮糖是 D-甘露糖[49]、蒜糖醇[50]等稀有糖醇的前体物质，使其在制糖工业中也有很大的应用潜力。此外，由 D-阿洛酮糖衍生的具有高透光性的永久环保薄膜在液晶显示和光学器件中也显示出潜在的应用价值[51]。

1.2 生物法制备 D-阿洛酮糖的研究概述

D-阿洛酮糖虽然能通过化学法合成，但化学法存在副产物多、效率低、对环境污染大等诸多问题，因而不是合成 D-阿洛酮糖的主要方法。化学生产工艺主要以下几种：一是以葡萄糖为原料，钼酸盐作为催化剂，在高温加热催化的条件下生产 D-阿洛酮糖[52]；二是以果糖为原料，在酒精和三乙胺混合体系中通过多步氧化还原反应制备阿洛酮糖[53]；三是利用糖酸内酯与二碘甲烷通过多步反应生成酮糖中间体，对羟基进行选择性保护及脱保护后合成 D-阿洛酮糖[54]，该方法最高得率仅为 9.8%。此外 Takamine 等[55]将高果糖玉米糖浆经碱化异构化开发出含 5% D-阿洛酮糖的糖浆。已有研究均表明化学法合成 D-阿洛酮糖难以应用在工业化生产。生物合成法是目前制备 D-阿洛酮糖的最常用方法，与化学合成法相比，具有选择性高、操作简便、绿色可持续等优点。生物法合成 D-阿洛酮糖主要包括单酶法和多酶级联催化法两种途径。

1.2.1 单酶法合成 D-阿洛酮糖

单酶法合成 D-阿洛酮糖的主要途径是 Izumoring 策略，它是一种利用差向异构酶（Ketose 3-epimerase，KEase）来获得各种稀有己酮糖的方法[56]，能适用于大多数稀有

酮糖的相互转化。Kim 等[57]从农杆菌中分离出一种酮糖 3-差相异构酶家族酶，由于该类酶对 D-阿洛酮糖具有很强的底物特异性，因此将其命名为 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（D-psicose 3-epimerase，DPEase）。DPEase 已成为 D-阿洛酮糖生物转化的主要催化剂，其独特的催化机制明显不同于其他差相异构酶，通过解析酮糖 3-差向异构酶分别与底物和共物质结合的复杂晶体结构，证明其对底物的修饰是 C3-O3 质子交换机制[58]。此后，人们对来源于梭状芽孢杆菌（*Clostridium cellulolyticum* H10）[59]、瘤胃球菌属（*Ruminococcus* sp.）[60]、芽孢链菌属（*Desmospora* sp.）[61]、芽孢杆菌（*Bacillus* sp.）[62]、以及小梨形菌（*Rhodopirellula baltica*）[63]等微生物的多种酮糖 3-差相异构酶进行了筛选和研究，表 1-2 列举了部分不同来源的酮糖 3-向异构酶的具体性质。酮糖 3-差相异构酶转化合成 D-阿洛酮糖的理论产率约为 50%，但是多数研究结果表明其实际转化率在 20%~30%左右。酮糖 3-差相异构酶具有较差的热稳定性是导致转化率较低的原因之一，近年来，学者们尝试使用各种方法手段例如定点突变、分子改造等对酮糖 3-差相异构酶进行改造来提高该酶的热稳定性[64,65]。除了 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶外，也有其它酶能实现类似的异构化功能，L-鼠李糖异构酶（L-rhamnose isomerase，EC 5.3.1.14）是一种醛糖-酮糖向异构酶，可以催化 D-阿洛糖和 D-阿洛酮糖两种稀有糖之间的异构化[66,67]，但底物 D-阿洛糖同样也是一种稀有糖，价格较为昂贵。综上所述，单酶法合成 D-阿洛酮糖的策略在工业应用上有一定的限制。

表 1-2 不同微生物来源的酮糖 3-差相异构酶的性质

Table 1-2 Properties of KEase from different microbial sources

酮糖 3-差相异构酶 微生物来源	表达宿主	最适 pH	最适反应 温度（℃）	转化率 （%）	参考 文献
Pseudomonas cichorii ST 24	*E. coli*.JM105	7.5-8.0	60	20.00	[68]
Rhodobacter Sphaeroides SK 011	*E. coli* BL21(DE3)	9.0	40	23.00	[69]
Rhodopirellula baltica SH 1	*B. subtilis* WB800	7.0	35	25.86	[70]
Christensenella minuta	*E. coli* Rosetta	6.0	50	30.00	[71]
Clostridium bolteae	*E. coli* BL21(DE3)	7.0	55	28.80	[72]
Dorea sp. CAG317	*B.subtilis* WB800	6.0	70	NR	[73]
Ruminococcus sp.	*Bacillus pumilus*	8.0	60	26.0	[74]
Agrobacterium tumefaciens	*K. marxianus*	8.0	55	25.30	[75]
C.cellulolyticum H10	*E. coli* BL21(DE3)	8.0	55	32.00	[59]

注：“NR”为未见报道

1.2.2 多酶法合成 D-阿洛酮糖

体外多酶合成体系是指从可再生资源中选择合适廉价且容易获得的底物，根据底物、产物和实现有效转化所需要的酶来设计代谢途径。所需的酶在宿主细胞中表达、提取并与反应底物、反应所需的辅酶等组装在一个容器中，进行“一锅式”酶促反应，

从而定向生产所需的高价值的产品[76,77]。体外多酶反应可以消除微生物发酵过程中维持细胞生存的中间体和资源竞争的损失[78]，同时还克服了传统发酵周期长、生产效率低、易受毒副产物抑制等不足[79,80]，反应也更加清洁[81,82]，因此体外多酶合成生物系统越来越多应用于高价值的生物医药化学品的合成中，具有良好的应用潜力[83,84]。

体外多酶合成体系主要由体外合成体系的构建、酶元件的挖掘、生产制备以及体系的工艺研究三部分构成，多酶级联催化的具体方式见图 1-3。目前利用多酶催化体系合成包括 D-阿洛酮糖在内的稀有酮糖的研究报道也越来越多[85]。例如，基于 Izumoring 策略[86]、醛缩酶策略[87]以及基于磷酸化-去磷酸机制的多酶催化体系[88]等。这些新路径在其他稀有糖的催化合成中取得了一定的进展，同时也为 D-阿洛酮糖的生物合成提供了新思路。

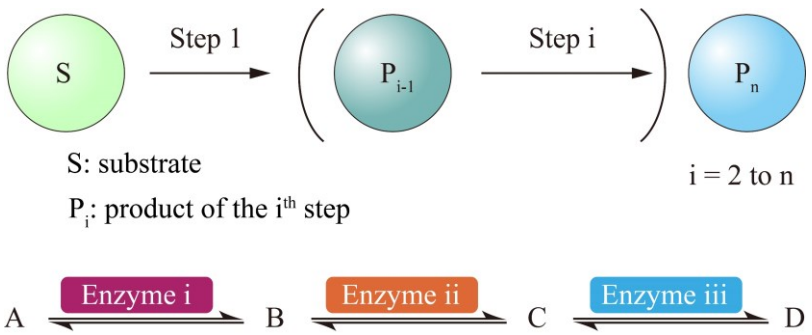

图 1-3 体外多酶级联反应

Figure 1-3 In vitro multi-enzyme cascade reaction

1.2.2.1 基于 Izumoring 策略的多酶级联催化体系

一些学者基于 Izumoring 策略，将酮糖 3-差向异构酶与其他异构酶偶联，达到将更廉价的底物转化为 D-阿洛酮糖的目的（见图 1-4）。以 D-果糖为中间产物，通过共表达、“一釜多酶”法或融合蛋白等方法，将酮糖 3-差向异构酶与葡萄糖异构酶（Glucose isomerase，GI）或其他异构酶偶联，利用 D-葡萄糖或菊粉可合成 D-阿洛酮糖。Li 等[89]将 D-木糖异构酶（D-xylose isomerase，XI）和 DPEase 固定在酿酒酵母孢子上，D-阿洛酮糖的最高产率达到 12%，Men 等[90]构建了在大肠杆菌工程菌株中共表达来自于芽孢杆菌的 GI 和来自于瘤胃球杆菌的 DPEase，以葡萄糖为底物在 65℃、pH 7.0 条件下反应 8 h， D-阿洛酮糖的转化率为 16%。

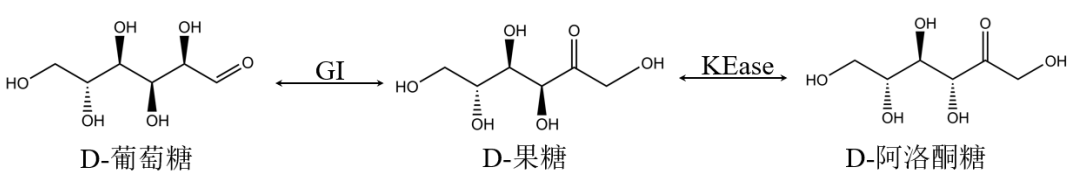

图 1-4 基于 Izumoring 策略合成 D-阿洛酮糖

Figure 1-4 The synthesis of D-allulose based on the Izumoring strategy

Li 等[91]开发了一釜双酶体系从菊粉中转化生产 D-阿洛酮糖，该体系包括外切菊粉

酶和来源于 *Dorea* sp.的 DPEase，以 100.0 g/L 菊粉为原料，D-阿洛酮糖的产率为 21.4 g/L。上述研究结果表明基于 Izumoring 策略以葡萄糖为底物出发合成 D-阿洛酮糖的路径受限于反应平衡，产率较低，后续分离纯化难度大，难以制备高纯度的目标稀有酮糖，因此该策略在 D-阿洛酮糖的生产应用中仍面临挑战。

1.2.2.2 基于醛缩酶策略的多酶催化体系

醛醇缩合是有机合成中形成新 C-C 键的重要合成方法之一[92]。如图 1-5 所示，作为 Izumoring 策略的补充，以磷酸二羟丙酮（Dihydroxyacetone phosphate，DHAP）为起始材料，D-甘油醛为受体利用 DHAP 依赖性醛缩酶与磷酸酶偶联生产稀有酮糖的策略已被研究报道[93]。由于底物 DHAP 价格昂贵且性质不稳定，制约了依赖 DHAP 醛缩酶的应用，因此有学者尝试从较廉价的底物出发，如甘油、D-葡萄糖、二羟基丙酮（Dihydroxyacetone，DHA）等合成中间产物 DHAP，再进行稀有糖的生产。Li 等[94,95]以 DHAP 为起始材料，D-甘油醛为受体，使用来自嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus* HB8）和海栖热袍菌（*Thermotoga maritima* MSB8）的 L-鼠李糖-1-磷酸醛缩酶（L-rhamnose-1-phosphate aldolase，RhaD），通过“一釜四酶法”策略生产包括 D-阿洛酮糖在内的四种稀有糖。在反应体系中，L-甘油磷酸被氧化生成DHAP，与甘油醛偶联生成 D-阿洛酮糖-1-磷酸，然后在酸性条件下去除磷酸基团，生成稀有酮糖。Chen 等[96]以甘油为底物出发，设计了基于 RhaD 的四种酶催化生物系统。在连续添加 D-甘油醛的半连续生物转化中，D-山梨糖和 D-阿洛酮糖的产率分别为 15.30 g/L 和 6.35 g/L。由于在醛醇合成 D-阿洛酮糖的过程中，RhaD 的立体选择性完全丧失，生成的产物不唯一，会产生 D-山梨糖等副产物，因此该策略对后续的分离纯化要求高，操作复杂，难以适用于规模化生产。

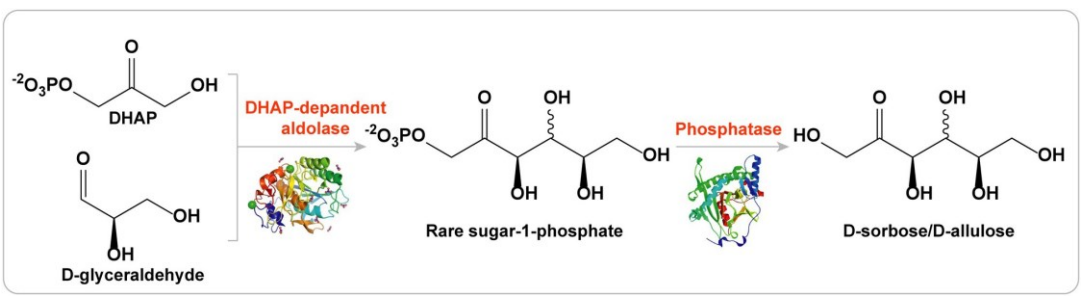

图 1-5 DHAP 依赖性醛缩酶合成 D-阿洛酮糖策略[97]

Figure 1-5 DHAP-dependent aldolases strategy for the production of D-allulose[97]

1.2.2.3 基于磷酸化-去磷酸机制的多酶催化体系

基于磷酸化−去磷酸机制的多酶催化体系已被应用于稀有糖的合成中。该体系主要将激酶、异构酶以及磷酸酶等酶元件进行组装，对底物进行多步转化最后生成目标产物，其中间产物包括多种磷酸化产物。据报道，通过将果糖激酶、II 型果糖 1,6-二磷酸醛缩酶以及磷酸酶进行级联反应合成 D-塔格糖，实现 96.3%的高转化率[98]。Li 等[99]设计并构建了基于磷酸化-脱磷酸化酶级联转化途径的体外合成酶生物体系（包括五种核

心酶及四种辅酶），以 10 g/L 和 50 g/L 淀粉为原料，D-阿洛酮糖产率最高分别达到 88.2%和 79.2%。Dai 等[100]人构建了从麦芽糊精出发经五步酶催化反应生成 D-塔格糖的多酶级联途径（见图 1-6），在 36 h 内由 150 g/L 麦芽糊精产生 3.919 g/L D-塔格糖。研究人员提出可以将 D-果糖 6-磷酸通过异构化和去磷酸化等反应转化生成 D-阿洛酮糖[57]，首先通过 D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差向异构酶（D-allulose 6-phosphate 3-epimerase，A6PE）将 D-果糖-6-磷酸转化为 D-阿洛酮糖-6-磷酸，再利用 D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶（D-allulose 6-phosphate phosphatase，A6PP）将 D-阿洛酮糖 6-磷酸转化为 D-阿洛酮糖。果糖 6-磷酸价格昂贵，因此可在双酶系统的基础上级联其他相关的酶制剂，从更廉价的底物出发合成 D-阿洛酮糖，目前从葡萄糖出发通过磷酸化-去磷酸化机制合成 D-阿洛酮糖的研究还鲜有报道，本研究将在 A6PE 和 A6PP 的双酶偶联基础上，级联聚磷酸葡萄糖激酶（Glucokinase polyphosphate，PPGK）和葡萄糖磷酸异构酶（Glucose 6-phosphate isomerase，PGI），设计一条基于该机制的从 D-葡萄糖为底物合成 D-阿洛酮糖的四酶级联反应体系。

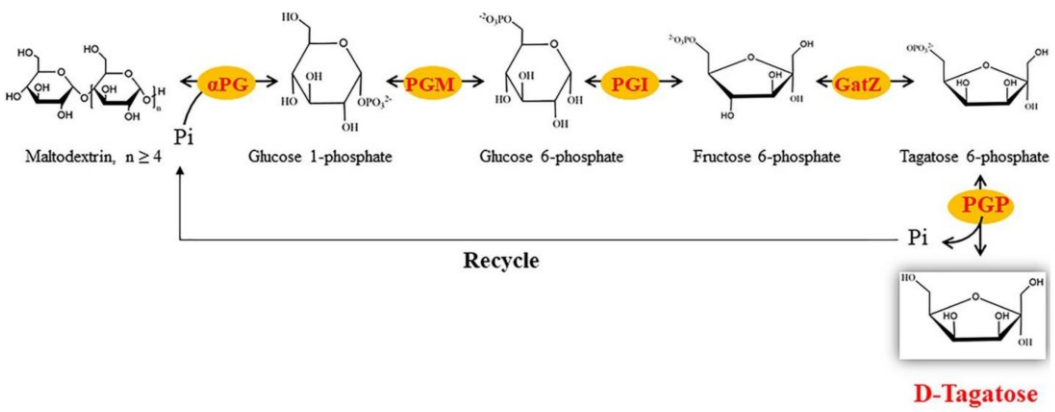

图 1-6 从淀粉出发合成 D-塔格糖的多酶级联途径[100]

Figure 1-6 D-Tagatose production from maltodextrin via a multi-enzymatic biosystem[100]

1.3 D-阿洛酮糖结晶工艺的研究概述

D-阿洛酮糖仅以 β-异头物的形式结晶，其晶体属于斜方晶系，其中吡喃糖基环由 O6-C2-C3-C4-C5-C6 组成，其构象为 $^2C_5$ 椅式构象[101]。D-阿洛酮糖具体的分子结构及晶胞结构见图 1-7。D-阿洛酮糖多羟基的结构特点，使其与蔗糖、果糖、甜菊糖等糖类物系一样在纯水体系中易形成密集的氢键交联网络[102,103]，其在水中溶解度大[5]，晶体生长速率低于蔗糖。由于糖类物系通常具有较宽的介稳区以及具有多羟基、溶剂极性强和热敏性等特点，因此包括 D-阿洛酮糖在内的糖类物质在结晶过程中都存在难以成核和生长缓慢等问题[104]。D-阿洛酮糖的结晶工艺是生产 D-阿洛酮糖产品的最后一步，D-阿洛酮糖在高温环境下易呈玻璃态以及结晶难度较大限制了产业发展。目前，D-阿洛酮糖的结晶主要为降温结晶法，包括在乙醇体系和纯水体系下进行冷却结晶。

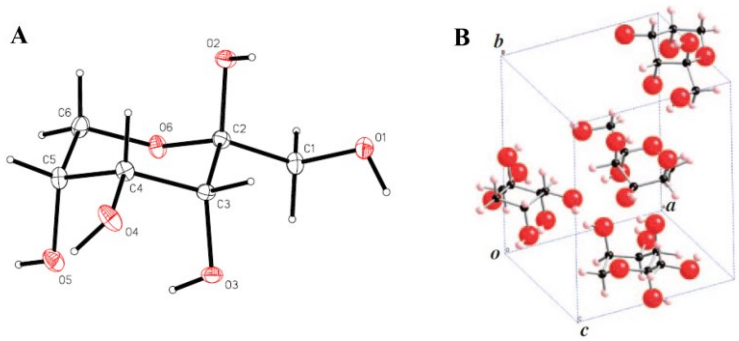

图 1-7 β-D-阿洛酮糖分子结构（A）和晶胞结构（B）[5]

Figure 1-7 Molecular structure (A) and the unit cell of β-D-allulose (B)[5]

Li 等[105]将通过模拟移动床分离的糖液在 60℃下真空蒸发浓缩至糖度为 75%，在过饱和溶液中加入 0.3%的 400 目的 D-阿洛酮糖晶种，在 72 h 内降温到 1℃制备 D-阿洛酮糖晶体，结晶率为 82%，该法存在结晶周期长，晶体粒径小等问题，只适合于小批量生产。郭元亨等[106]人通过响应面法优化在乙醇体系下的 D-阿洛酮糖结晶工艺，综合考察了结晶温度、时间、乙醇的料液比等因素，结晶回收率较高，但是此法在结晶过程中需使用大量的有机试剂，有机溶剂属于易燃易爆品，存在安全隐患，因此需购置防爆设备，额外增加了生产成本，不符合绿色生产理念。此外有产品残留的有机试剂会对产品质量造成影响，因此在结晶过程中应最大程度减少乙醇等有机溶剂的使用。

在采用冷却结晶法进行工业生产时，必须对结晶过程中出现的自成核现象进行控制，避免出现产品结块等问题[107]。优化结晶条件能避免初级成核现象发生，降低体系黏度。目前国内有关 D-阿洛酮糖分离纯化与结晶下游工艺的研究较少，相关产业相对滞后，因此需进一步优化 D-阿洛酮糖结晶工艺，降低生产成本和提高产能。

1.4 课题研究意义及内容

1.4.1 研究意义

根据世界卫生组织的数据库，全球约有超过 19 亿成年人超重，6.5 亿人肥胖，4.22 亿人患糖尿病，11.3 亿人患高血压[108]。高糖、高脂肪食物的过量摄入会导致上述慢性疾病的产生。随着公众健康意识的不断提高，具有特殊生理功能的低热量稀有糖受到越来越多的关注。D-阿洛酮糖具有热量低、口感甜润等特点，同时具备多种生理功能，可广泛应用于生物医药及食品加工生产。目前 D-阿洛酮糖的生产主要集中在日本、韩国、美国等地区，我国 D-阿洛酮糖生产的相关企业研究存在起步较晚，规模相对较小、生产成本较高等问题，仍有较大发展空间。根据目前的报道，生物法合成 D-阿洛酮糖仍然面临着转化率低、底物成本高、产物不专一等问题；结晶工艺同样存在结晶周期长、回收率低、有机试剂耗费量高等弊端，因此，提高酶法制备 D-阿洛酮糖的产率、优化结晶生产条件对于稀有糖产业具有重要的意义。

PPGK 可以将末端磷酸基从聚磷酸盐移到葡萄糖上，生成葡萄糖-6-磷酸，并且只需要六偏磷酸钠作为磷酸供体，无需添加 ATP 等昂贵辅因子，PGI 能将葡萄糖-6-磷酸

转化为果糖 6-磷酸，从而与 A6PE 及 A6PP 双酶系统组装合成 D-阿洛酮糖。此外嗜热菌来源的酶元件的热稳定性较高，能适应制糖工业在高温条件下的生产。

综上所述，本研究通过将不同嗜热菌来源的 PPGK、PGI、A6PE 以及 A6PP 在大肠杆菌中进行异源表达，构建以 D-葡萄糖为底物合成 D-阿洛酮糖的多酶级联催化体系；并详细研究热纤梭菌来源的重组 A6PP 的酶学性质，进一步确定多酶级联体系中各酶的适配性；通过对该多酶级联体系的可行性验证和反应条件的探究，证明该体系应用于 D-阿洛酮糖工业生产的潜力。此外优化 D-阿洛酮糖的冷却结晶工艺，有效提高结晶回收率，本研究将为 D-阿洛酮糖的绿色生产提供一定的理论参考。

1.4.2 主要研究内容

本论文的技术路线图见图 1-8，主要研究内容包括以下三个方面：

（1）设计符合热力学驱动的多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系，构建不同的重组大肠杆菌实现对多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系所用酶的异源表达。进一步详细研究热纤梭菌来源的重组 A6PP 的酶学性质，包括：最适温度、pH、金属离子依赖性、热稳定性、储藏稳定性、底物特异性、底物催化模型；考察体系中其他重组酶的最适温度、pH 及金属离子依赖性，分析级联体系中各酶的兼容适配性。

（2）组装多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖反应体系，通过鉴定反应终产物，验证该多酶级联反应体系的可行性。进一步优化多酶级联反应条件以提高 D-阿洛酮糖产率，包括：反应温度、反应 pH、酶的负载量、六偏磷酸钠浓度和镁离子浓度等因素，并探讨扩大反应体系对多酶级联体系合成 D-阿洛酮糖产率的影响。

（3）优化冷却结晶法制备 D-阿洛酮糖晶体的工艺，探究不同因素对冷却结晶的影响，包括：料液浓度、结晶终点温度、降温速率和搅拌速率。并对优化工艺后制备的结晶产品进行晶体性质表征及分析，包括：热分析、晶形结构、表观形貌和产品流动性。

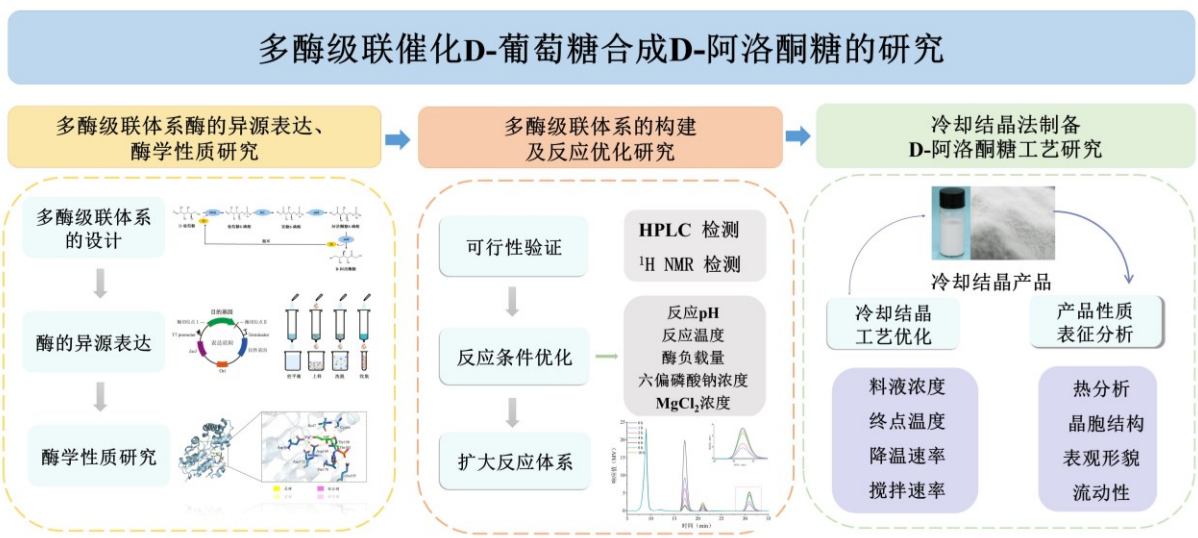

图 1-8 本研究技术路线图

Figure 1-8 The technical route of this study

第二章 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的异源表达及酶学性质研究

2.1 引言

D-阿洛酮糖作为一种典型稀有酮糖，在食品、药品、保健品等领域具有广泛应用。体外多酶级联催化技术具有高产率、宽泛的反应条件等优势，已成为研究热点。近年来利用基于磷酸化-去磷酸机制的多酶催化体系合成高价值附加物的相关报道较多，如 You 等[109]构建了以淀粉为底物合成肌醇的体外多酶合成生物系统，产率达到 98.9% ± 1.8%。多酶级联体系要求多个酶催化剂及辅因子等物质在“一釜”中进行反应，在设计级联催化反应路线时要考虑到单个酶催化剂的最适 pH 范围、反应温度以及金属离子依赖性等是否能够重叠[110]，因此需要对级联反应体系的酶催化剂进行酶学性质研究，以确定该体系的兼容性。

本章基于磷酸化-去磷酸化机制，设计催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖的多酶级联反应体系。该体系中所用的酶元件包括聚磷酸葡萄糖激酶（EC 2.7.1.63）、葡萄糖磷酸异构酶（EC 5.3.1.9）、D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差向异构酶（EC 5.1.3.-）和 D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶（EC 3.1.3.-）。以 *E.coli* BL21（DE3）为表达宿主，分别对不同微生物来源的上述四种酶进行异源表达；在此基础上，详细研究重组 D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶的酶学性质，并分析四种重组酶在级联体系中的适配性。

2.2 实验材料与试剂

2.2.1 菌株及质粒

实验所用质粒和菌株如表 2-1 所示。

表 2-1 菌株和质粒

Table 2-1 Strains and plasmids

质粒/菌株	特征	来源
pET28a-*ppgk*	Kanamycin 抗性、T7 启动子，含 *ppgk* 基因	本实验构建
pET28a-*pgi*	Kanamycin 抗性、T7 启动子，含 *pgi* 基因	本实验构建
pET20b-*a6pe*	Ampicillin 抗性、T7 启动子，含 *a6pe* 基因	本实验构建
pET28a-*a6pp*	Kanamycin 抗性、T7 启动子，含 *a6pp* 基因	本实验构建
E.coli BL21（DE3）	表达宿主	实验室保存
BL21（DE3，pET28a-ppgk）	PPGK 的表达菌株	本实验构建
BL21（DE3，pET28a-pgi）	PGI 的表达菌株	本实验构建
BL21（DE3，pET20b-a6pe）	A6PE 的表达菌株	本实验构建
BL21（DE3，pET28a-a6pp）	A6PP 的表达菌株	本实验构建

2.2.2 材料、试剂与试剂盒

D-阿洛酮糖、D-果糖、D-葡萄糖、六偏磷酸钠、β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）、葡萄糖 6-磷酸脱氢酶（Glucose-6-phosphate dehydrogenase，G6PDH；500 U；来源于酿酒酵母）均购于上海阿拉丁（Aladdin）生化科技股份有限公司；D-果糖 6-磷酸二钠盐、D-葡萄糖 6-磷酸单钠盐、D-葡萄糖 1-磷酸二钠盐购于上海源叶生物科技有限公司；酵母粉、胰蛋白胨、葡萄糖等购于国药集团；卡那霉素（Kana）、氨苄青霉素（Amp）、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（Isopropyl β-D-thiogalactoside，IPTG）、BCA 蛋白定量试剂盒、5×蛋白电泳上样缓冲液等购于上海生物工程公司；5 mL HisTrap HP 柱购于 GE Healthcare 公司；BeyoGel™ Plus PAGE 预制胶（4%~20%）、蛋白 Marker 及孔雀绿磷酸盐检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司；实验所用超纯水来源于 Direct-Q3 超纯水制备机。

2.2.3 仪器与设备

生化培养箱（型号：LRH-70，上海一恒仪器公司）；振荡培养箱（型号：ZQZY-88AE，上海知楚仪器有限公司）；立式压力蒸汽灭菌器（型号：LDZX-50kBS，上海申安医疗器械厂）；多功能酶标仪（型号：Synergy H1，美国伯腾仪器有限公司）；FiveEasy Plus pH 计（梅特勒-托利多国际贸易有限公司）；生物安全柜（型号：1300 系列Ⅱ型 A2，美国赛默飞世尔科技公司）；高速冷冻离心机（型号：5804R，德国艾本德股份有限公司）；数显智能控温磁力搅拌器（型号：SZCL-2A，瑞佳精密科学仪器有限公司）；PowerPac Basic 基础电泳仪（美国伯乐公司）；凝胶成像系统（型号：GenoSens 2000，上海勤翔凝科学仪器有限公司）。

2.2.4 主要试剂的配制

（1）LB 培养基：参照《分子克隆实验指南（第三版）》配制液体及固体 LB 培养基，121℃，20 min 灭菌备用。

（2）1.0 mol/L IPTG：称取 2.4 g IPTG 溶于 10.0 mL 无菌水中，0.22 μm 滤膜过滤除菌，-20°C 贮存备用。

（3）50.0 mg/mL Kana：称取 0.5 g Kana 粉末溶于 10.0 mL 无菌水中，0.22 μm 水系滤膜过滤除菌，-20°C 贮存备用。

（4）100.0 mg/mL Amp：将 1.0 g 的 Amp 粉末溶于 10.0 mL 无菌水中，0.22 μm 水系滤膜过滤除菌，-20°C 贮存备用。

（5）50 mmol/L Tris-HCl 破胞缓冲液：称取 6.06 g Tris 溶于一定量超纯水中，用 HCl 调节溶液 pH 值至 7.4，定容至 1000.0 mL。

（6）蛋白纯化相关溶液

结合液：称取 6.06 g Tris、29.22 g NaCl、1.36 g 咪唑溶于一定量超纯水中，调节 pH 至 7.4，定容至 1000.0 mL。

洗脱液：称取 6.06 g Tris、29.22 g NaCl、34.04 g 咪唑溶于一定量超纯水中，调节

pH 至 7.4，定容至 1000.0 mL。

100 mmol/L EDTA 溶液：称取 3.72 g EDTA 二钠盐溶于 100.0 mL 超纯水中。

2.3 实验方法

2.3.1 重组质粒的构建

编码来源于褐色嗜热裂胞菌（*Thermobifida fusca* YX）PPGK 的基因 *ppgk*，Genbank 登录号为 WP_011292235.1；编码来源于 *T. thermophilus* HB8 PGI 的基因 *pgi*，Genbank 登录号为 WP_011227825.1；编码来源于热纤梭菌（*Clostridium thermocellum*）A6PP 的基因 *a6pp*，Genbank 登录号为 WP_003512401.1。将编码 *ppgk*、*pgi*、*a6pp* 的核苷酸序列进行密码子优化后，交由南京金斯瑞生物有限公司合成。分别通过限制性核酸内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 的作用位点连接至载体 pET-28a(+)，同时保留 pET-28a(+)自身 C 端 6×His 标签，获得 pET28a-*ppgk*、pET28a-*pgi* 以及 pET28a-*a6pp*。编码来源于热解糖梭菌（*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* DSM 571）A6PE 的基因 *a6pe*，Genbank 登录号为 WP_013298194，将 *a6pe* 的核苷酸序列通过密码子优化后，同样交由南京金斯瑞生物有限公司合成。由于 pET20b 载体的 N 端带有 *pel*B 分泌信号序列，目的蛋白可以被引导入周质空间，进而提高目的蛋白的可溶性表达，因此将 *a6pe* 基因插入到 pET20b(+)的限制性核酸内切酶 *Nde I* 和 *Xho* I 作用位点之间，获得重组质粒 pET20b-*a6pe*，重组质粒的构建操作流程和构建方式如图 2-1 所示。

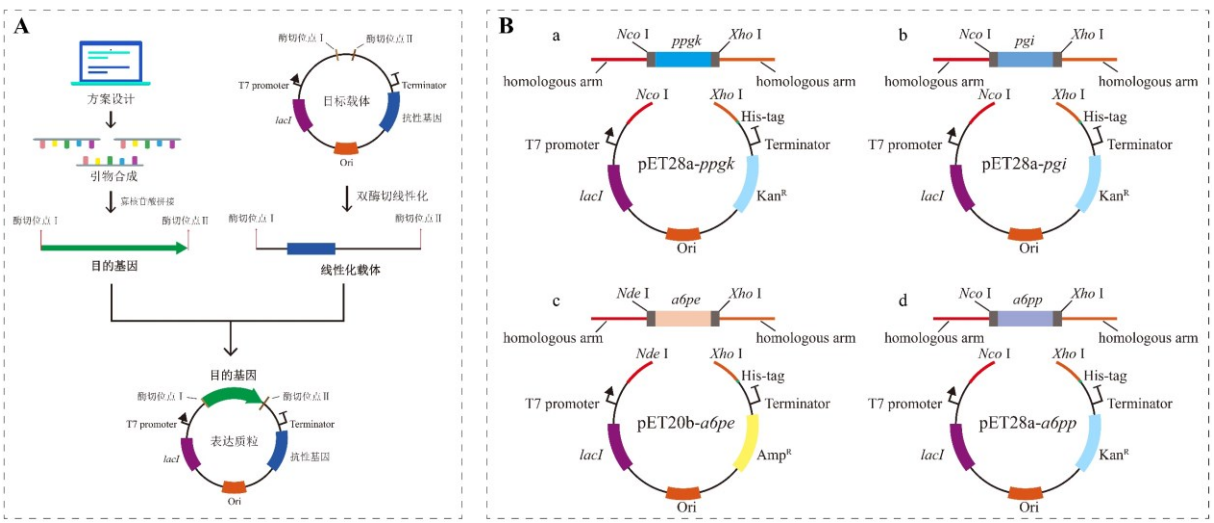

图 2-1 重组质粒的构建：操作流程图（A）和质粒示意图（B）

Figure 2-1 Construction of recombinant plasmids. Operation flowchart (A) and schematic diagram of construction of recombinant plasmids (B)

2.3.2 重组菌的构建

2.3.2.1 *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞制备

挑取 *E. coli* BL21（DE3）的单菌落至含有 LB 液体培养基的试管中，于 37°C，200 r/min 条件下培养 8~10 h。取 50 μL 活化后的 *E. coli* BL21（DE3）种子液至含有 50.0 mL

LB 液体培养基的锥形瓶中进行扩大培养，培养条件同上。扩大培养至 OD_{600} = 0.4~0.6，于 4℃，4000 r/min 离心 5 min，去上清，收集菌体。取 10.0 mL 预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 溶液重悬菌体，冰浴 20 min 后于 4℃，4000 r/min 离心 10 min，去上清，收集菌体。取 1.0 mL 预冷的 0.1 mol/L $CaCl_2$ 甘油溶液重悬菌体，冰浴 10 min 后，将制备的感受态细胞溶液分装至无菌 Ep 管中（每管 100 μL），-80℃贮存备用。

2.3.2.2 质粒转化

将 1 μL 构建的重组质粒加入到 100 μL *E. coli* BL21（DE3）感受态细胞中，轻柔混匀，冰浴 30 min。冰浴结束后，在 42℃条件下热激 90 s，继续冰浴 2~3 min。加入 500 μL 不含任何抗生素的 LB 液体培养基，在 37°C 下孵育约 1 h。取 200 μL 培养后的菌液涂布到相应抗性的 LB 固体平板上，置于恒温培养箱（37°C）过夜培养。

2.3.3 重组蛋白的诱导表达

挑取构建成功的四种重组菌的转化子，接种至含有相应抗性的 6 mL LB 液体培养基试管中，37℃、200 r/min 条件下培养 10~12 h。吸取 1%的种子液转接至含有相应抗性的 100 mL LB 液体培养基锥形瓶中，以 37℃、200 r/min 的条件扩大培养至 OD_{600} = 0.6~0.8，加入终浓度为 0.05~0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG 于 16~18℃诱导表达 20 h。冰浴 10 min 停止诱导，于 4℃以 8000 r/min 离心 10 min，收集菌体，使用 Tris-HCl 破胞缓冲液重悬洗涤菌体 2~3 次，离心后于-20℃储存备用。取部分收集的菌体使用 Tris-HCl 破胞缓冲液重悬，调节菌液浓度至 $OD_{600} \approx 50$，将重悬液置于冰浴中，进行超声破胞，破胞条件：破胞功率 300 W，开 2 s，关 2 s，总时间 10 min。破胞结束后，在 4℃条件下以 12000 r/min 离心 20 min，收集破胞上清液，过 0.22 μm 水系滤膜，于 4℃保存备用。采用 BCA 蛋白定量试剂盒对破胞上清液进行蛋白定量。

2.3.4 重组蛋白的纯化及验证

采用 His Trap™ HP（规格为 5 mL）镍柱对目的蛋白进行亲和层析纯化，纯化参数如下：破胞上清液上样量为 10 mL，以 1 mL/min 的流速上样；蛋白结合液、洗脱液、超纯水上样体积均为 5~10 个柱体积，即 25~50 mL，以 5 mL/min 的流速上样。纯化结束后使用 10 mL 0.1 mol/L EDTA 除镍，20%乙醇溶液封柱，HisTrap™ HP 柱保存于 4℃，所有溶液均需过 0.22 μm 水系滤膜。使用超滤管对收集的样品进行浓缩并达到脱盐目的。测定浓缩后的样品蛋白浓度，取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，以验证目的蛋白的大小和纯化效果。取 40 μL 纯化后的酶液与 10 μL 5×上样缓冲液混匀，沸水煮 10 min 后离心 10 min，取 10 μL 进行上样，具体的实验步骤参考文献报道[111]。

2.3.5 酶活力测定方法

2.3.5.1 聚磷酸葡萄糖激酶酶活力测定方法

重组 PPGK 酶活可根据 D-葡萄糖转化生成的葡萄糖 6-磷酸（Glucose 6-phosphate，

G6P）总量计算。PPGK 酶活检测方法：酶活反应体系包括 5.0 mmol/L D-葡萄糖，50.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0）（含有 4.0 mmol/L $MgCl_2$，1.0 mmol/L 六偏磷酸钠）。反应起始加入 PPGK 酶液，在 50℃条件下反应 10 min，然后冰浴 10 min 以终止反应。采用酶法检测 G6P 含量，检测原理如图 2-2 所示，G6P 被 G6PDH 氧化为葡萄糖酸 6-磷酸，而 NAD^+被还原为 NADH。具体测定方法为[112]：将 0.1 mL 的反应液与 3.0 mL 含有 100.0 mmol/L HEPES 缓冲液（pH 7.0），2.0 mmol/L $MgCl_2$，0.2 mmol/L NAD^+和 0.7 U G6PDH 混合，在 30℃下，测定 10 min 内 340 nm 波长下吸光值的变化量（ε340 nm = 6220 M^{-1} cm^{-1})。通过 NAD^+的减少量计算 G6P 含量。PPGK 的酶活（U）定义为在 50℃条件下，每分钟催化 D-葡萄糖生成 1.0 μmol G6P 所需的重组 PPGK 酶量。

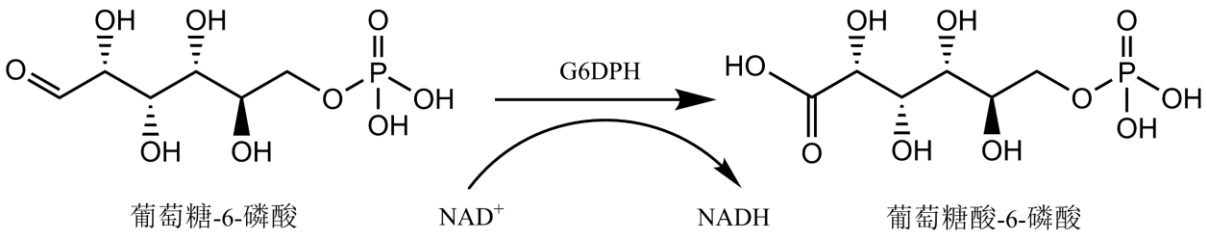

图 2-2 G6P 含量测定原理图

Figure 2-2 Schematic diagram of G6P content determination

2.3.5.2 葡萄糖异构酶酶活力测定方法

重组 PGI 酶活可通过测定反应产生的 G6P 总量计算。检测方法参照 Wang 等[113]报道方法并稍作修改，具体反应体系为：5.0 mmol/L 果糖 6-磷酸（Fructose 6-phosphate，F6P），50.0 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7.0，包括 4.0 mmol/L $MgCl_2$），反应起始加入重组 PGI 纯酶液。在 50°C 条件下反应 10 min，然后冰浴 10 min 终止反应。按照方法 2.3.5.1 测定产物 G6P 的含量。PGI 的酶活（U）定义为 50℃条件下，每分钟催化 F6P 生成 1.0 μmol G6P 所需的重组 PGI 酶量。

2.3.5.3 D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差相异构酶酶活力测定方法

重组 A6PE 酶活可根据其转化 F6P 生成 D-阿洛酮糖 6-磷酸（D-allulose 6-phosphate，A6P）的总量计算，需要偶联重组 A6PP 进行脱磷酸化处理，根据双酶偶联体系终产物 D-阿洛酮糖生成量推算 A6P 的含量。重组 A6PE 酶活测定参照 Li 等[114]报道方法并稍作修改：反应体系为 50.0 mmol/L HEPES 缓冲液（pH 7.0），5.0 mmol/L F6P，5.0 mmol/L $MgCl_2$。反应起始加入重组 A6PE 酶液，在 50℃时进行 10 min，冰浴 10 min 终止反应。向上述反应液中加入 2.0 U/mL 重组 A6PP 酶液，将生成的 A6P 转化成 D-阿洛酮糖。将处理后的反应液经 0.22 μm 水系滤膜过滤，使用 HPLC 测定反应液中 D-阿洛酮糖的生成量，进而推算生成的 A6P 的含量。A6PE 的酶活（U）定义为 50℃条件下，每分钟生成 1.0 μmol A6P 所需的重组 A6PE 酶量。

2.3.5.4 阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶酶活力测定方法

重组 A6PP 酶活可根据其释放的无机磷酸盐的总量计算。重组 A6PP 酶活检测方法为：酶活反应体系包括 50.0 mmol/L HEPES 缓冲液（pH 7.0），5.0 mmol/L F6P，5.0 mmol/L $MgCl_2$，反应起始加入重组 A6PP 酶液，在 50℃条件下反应 5 min 后，冰浴 10 min 终止反应，以不加 A6PP 作为对照。无机磷酸盐的测定采用孔雀石绿显色法，体系中游离的磷酸根与显色剂中的钼酸根形成磷钼杂多酸缔合物，再与孔雀石绿形成绿色显色复合物。将反应液稀释 5 倍后，取稀释后的 200 μL 反应液与 70 μL 显色剂混合，反应约 30 min，于 630 nm 测定吸光度，根据磷酸盐浓度标曲计算体系中游离的无机磷酸盐含量。重组 A6PP 的酶活（U）定义为 50℃条件下，每分钟生成 1.0 μmol 无机磷酸盐所需的重组 A6PP 酶量。

2.3.6 重组 A6PP 酶学性质研究

2.3.6.1 重组 A6PP 的最适温度

以 5.0 mmol/L F6P 作为底物，在 50.0 mmol/L HEPES 缓冲液（pH 7.0）的条件下，分别测定重组 A6PP 在 30、40、50、60、70、80、90℃下的酶活力，反应条件同 2.3.5.4，并将最高酶活定义为 100%。

2.3.6.2 重组 A6PP 的最适 pH

在不同 pH 条件下测定重组 A6PP 最适 pH，分别配制浓度为 50.0 mmol/L 的 HAc-NaAc（pH 3.5~5.0）、MES-NaOH（pH 5.0~6.5）、HEPES-NaOH（pH 6.5~7.5）以及 Tris-HCl（pH 7.5~8.5）缓冲液，分别测定重组 A6PP 在上述不同缓冲液体系下的酶活力，反应条件同 2.3.5.4，将最高酶活定义为 100%。

2.3.6.3 重组 A6PP 的金属离子依赖性

为研究二价金属离子对重组 A6PP 酶活影响，在反应液中添加 5.0 mmol/L 的金属离子（Co^{2+}、Cu^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Ca^{2+}及 Mg^{2+}），测定重组 A6PP 的酶活力，反应条件同 2.3.5.4，以未添加任何金属离子的重组 A6PP 酶液作为空白对照，将空白对照组的酶活定义为 100%。

2.3.6.4 重组 A6PP 的热稳定性

为测定重组 A6PP 热稳定性，将重组 A6PP 纯酶液分别置于 50、60、70℃下孵育 3 h，每隔 30 min 取样，测定重组 A6PP 的残余酶活，反应条件同 2.3.5.4，并将初始的酶活定义为 100%。

2.3.6.5 重组 A6PP 的储藏稳定性

为测定重组 A6PP 储藏稳定性，将重组 A6PP 纯酶液置于 4℃冰箱保存，分别于第 0、5、10、15 以及 20 d 取样测定酶的活力，反应条件同 2.3.5.4，将第 0 d 的重组 A6PP

酶活力定义为 100%。

2.3.6.6 重组 A6PP 底物特异性及动力学研究

为测定重组 A6PP 底物特异性以及酶动力学参数，在 50℃，pH 7.0 条件下分别以不同浓度（1.0~10.0 mmol/L）的 G1P、G6P、F6P 以及 A6P 作为底物，加入重组 A6PP 反应 5 min，根据 Hanes-Woolf plot 法计算重组 A6PP 的在不同底物下的 K_m 和 k_{cat} 值。

2.3.6.7 *C. thermocellum* A6PP 底物催化模型的构建

（1）底物小分子的准备

从 PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库中检索 D-阿洛酮糖-6-磷酸分子结构，然后通过 Schrödinger 软件获得 D-阿洛酮糖-6-磷酸的 3D 结构，确定坐标以及所有 D-阿洛酮糖-6-磷酸分子可能的立体异构体、有关的质子化状态。

（2）*C. thermocellum* A6PP 蛋白准备

将本研究涉及的编码 *C. thermocellum* A6PP 的氨基酸序列提交至依靠神经网络与深度计算学习的在线预测工具 AlphaFold2 网站（https://www.alphafold.ebi.ac.uk/）进行蛋白模建，从建模结果中下载得分最高的蛋白模型。使用 Schrödinger 软件对 *C. thermocellum* A6PP 蛋白结构进行分配键级、加氢、等操作，并去除 *C. thermocellum* A6PP 中的水分子以及相关辅因子，同时优化氢键网络，并最小化蛋白质能量。

（3）分子对接

进一步进行分子对接，使用 SiteMap 探测 *C. thermocellum* A6PP 蛋白口袋，坐标为 x = 7.1，y = 5.08，z = 4，外盒定义为 8 Å，内盒的大小设置为 10 Å。采用 SP-docking 对 *C. thermocellum* A6PP 蛋白与底物 D-阿洛酮糖 6-磷酸进行分子对接，从分子对接结果中下载得分最高的催化模型。

2.3.7 重组酶适配性研究

为研究多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系中各酶的适配性，分别测定重组 PPGK、PGI、A6PE 的最适温度、pH 以及金属离子。最适温度的测定方法如下：分别测定重组 PPGK、PGI、A6PE 在 30~90℃下的酶活力，其他反应条件同 2.3.5 所述酶活测定体系，确定重组 PPGK、PGI、A6PE 的最适温度；最适 pH 的测定方法如下：分别测定重组 PPGK、PGI、A6PE 在 pH 3.5~8.5 下的酶活力，其他反应条件同 2.3.5 所述酶活测定体系，确定重组 PPGK、PGI、A6PE 的最适 pH；最适金属离子测定方法如下：分别测定重组 PPGK、PGI、A6PE 在终浓度为 1.0 mmol/L 的 Co^{2+}、Cu^{2+}、Ni^{2+}、Fe^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}以及未添加金属离子参与下的酶活力，其他反应条件同 2.3.5 所述酶活测定体系，确定重组 PPGK、PGI、A6PE 的最适金属离子。

2.3.8 实验数据分析软件

以上进行三次平行实验，实验结果用平均值 ± 标准差（SD）表示。数据分析软件为：Graphpad Prizm 8、Origin 2021、PyMol、Schrödinger、IBM SPSS Statistics 25。

2.4 结果与讨论

2.4.1 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系的设计

如图 2-3 所示，本研究设计了基于磷酸化-去磷酸机制的体外多酶催化体系，用于转化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖。该体系包括的四步酶催化反应分别为反应（1）：PPGK 将末端磷酸基从聚磷酸盐移到 D-葡萄糖上，生成 G6P；反应（2）：G6P 被 PGI 异构化生成 F6P；反应（3）：经 A6PE 催化作用，F6P 差相异构化生成 A6P；反应（4）：A6P 经 A6PP 的脱磷酸作用生成目标产物 D-阿洛酮糖。该体系在反应过程中不需要加入 ATP 或者 NAD(P)H 等额外的昂贵辅因子，并且还能实现体系中无机磷酸盐的自循环。

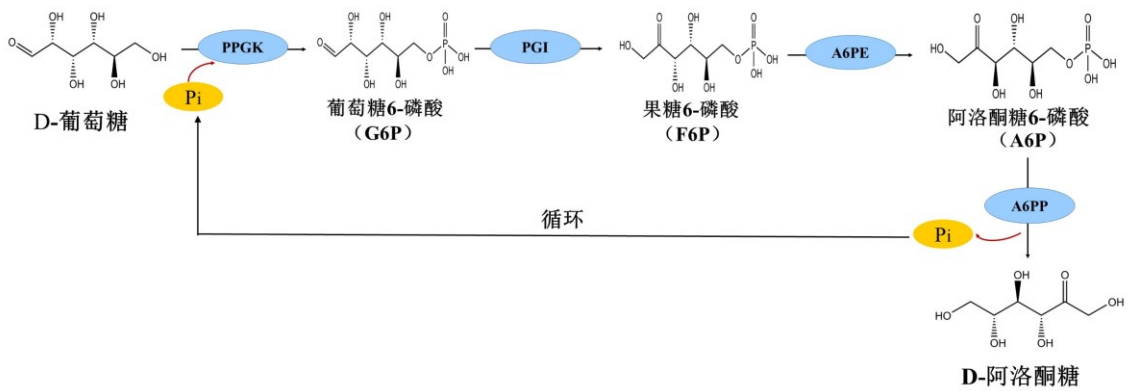

图 2-3 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系示意图

Figure 2-3 Diagram of the multi-enzyme cascade system for synthesis of D-allulose from D-glucose

多酶催化体系的设计原则是需要对级联反应合成路径中多步酶反应过程进行热力学和动力学分析，要求在热力学上必须是正向可行的，即 $\Delta G'_{cascade} < 0$[115]；而当最后一步催化反应为不可逆反应时，可以极大提高目标产物的生成率。在 pH 为 7.0，离子强度为 100 mmol/L 测试条件下（http://equilibrator.weizmann.ac.il/），本研究四步酶催化反应的 ΔG'° 的变化情况如图 2-4 所示。

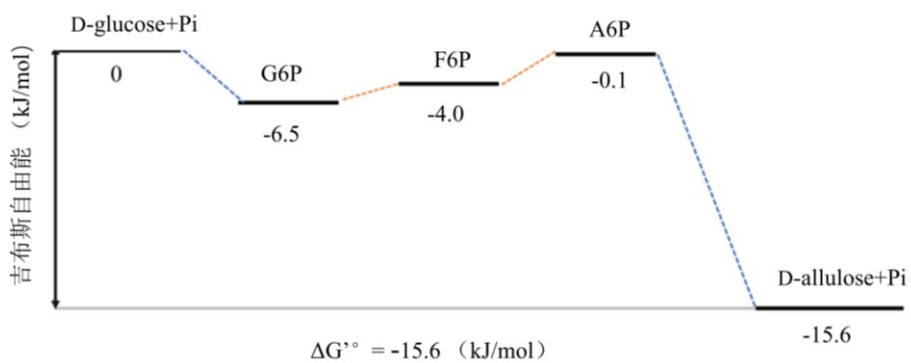

图 2-4 D-阿洛酮糖合成路径的吉布斯自由能变化

Figure 2-4 Standard Gibbs free energy changes in the D-allulose synthesis pathway

由图 2-4 可知，该多酶级联催化体系的总反应 ΔG'° 为-15.6 kJ/mol，其中最后一步 A6PP 催化的 A6P 脱磷酸生成 D-阿洛酮糖的反应的 ΔG'° 为-15.5 kJ/mol，且该步反应为

不可逆的反应，能极大促进反应正向进行。因此，本研究所设计的级联反应体系是符合热力学驱动的，可以向目标终产物自发进行。

2.4.2 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的选择

从多酶合成体系的稳定性和适配性角度考虑，合成体系中选用的酶应有较好的热稳定性，且各酶的最适 pH 等相关酶学性质应具有良好的匹配性[116]。通过文献调研和 NCBI、UniProt 等数据库对酶元件进行筛选和比对，并基于体系热稳定性的考虑，本研究选择来源于嗜热菌的酶，热稳定性酶可以经受反应过程的加热步骤，降低微生物对生物合成系统产生有害影响的可能。多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系中所涉及的四种酶的基本信息见表 2-2。

表 2-2 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的基本信息

Table 2-2 The information of each enzyme in the synthesis of D-allulose from D-glucose used a multi-enzyme catalytic system

酶	EC 号	NCBI 号	亚基分子量（kDa）	ΔG'°（kJ/mol）
聚磷酸葡萄糖激酶（PPGK）	2.7.1.63	WP_011292235.1	27	~-6.5
磷酸葡萄糖激酶（PGI）	5.3.1.9	WP_011227825.1	46	2.5
D-阿洛酮糖 6-磷酸 3-差向异构酶（A6PE）	5.1.3.-	WP_013298194.1	25	3.9
D-阿洛酮糖 6-磷酸磷酸酶（A6PP）	3.1.3.-	WP_003512401.1	24	-15.5

本研究选择来源于 *T. fusca* YX 的 PPGK，PPGK 可以在不补充 ATP 的条件下，使用聚磷酸[(Pi)n]（六偏磷酸钠提供聚磷酸基团）作为磷酸化供体，将末端磷酸基从聚磷酸盐移到葡萄糖上，生成葡萄糖-6-磷酸，显示出巨大的 G6P 生产潜力[117,118]，在磷酸化-去磷酸化多酶级联机制中有很好的应用前景。同时选择了来源于嗜热菌 *T. thermophilus* HB8 的 PGI，PGI 可以催化葡萄糖 6-磷酸发生异构化反应，转化生成果糖 6-磷酸，以及来源于 *T. thermosaccharolyticum* DSM 571 的 A6PE 能够催化果糖 6-磷酸在 C3 位置上发生异构化反应生成 D-阿洛酮糖 6-磷酸[119]。

磷酸酶在去磷酸-磷酸化机制的级联体系中催化最后一步脱磷酸反应，因此对多酶级联反应体系的产率起着重要作用。卤代酸脱卤酶（Haloacid dehalogenase，HAD）家族酶是已知的最大酶类之一，HAD 家族磷酸酶具有不可逆的催化含磷化合物中磷酸基团水解的功能作用。根据已报道的研究，肌醇单磷酸酶可以在多酶级联催化系统中将中间代谢物肌醇 1-磷酸脱去磷酸基团，从而生成目标产物肌醇[109]；Lee 等[120]将编码脱磷酶的 YqaB 在酿酒酵母中实现异源表达，催化中间代谢物 N-乙酰氨基葡萄糖 6-磷酸发生脱磷酸作用，生产高价值的 N-乙酰氨基葡萄糖。还有更多的 HAD 家族磷酸酶有待

研究人员挖掘表征及应用，从而拓宽更多高附加值产品的合成生产途径。通过筛选和比对，本研究选择了来源于 *C. thermocellum* 的 A6PP 作为去磷酸酶，催化级联体系中最后一步反应，脱去 A6P 的磷酸基团，生成目标产物 D-阿洛酮糖。

2.4.3 多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖用酶的异源表达及纯化

将多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系中所用的 PPGK、PGI、A6PE、A6PP 四种酶分别在 *E.coli* BL21（DE3）中进行异源表达。按照方法 2.3.1 分别构建了 pET28a-*ppgk*、pET28a-*pgi*、pET20b-*a6pe*、pET28a-*a6pp* 四种重组质粒。将构建好的重组质粒参照方法 2.3.2 分别转化到 *E.coli* BL21（DE3）感受态细胞中，构建 *E.coli* BL21（DE3，pET28a-ppgk）、*E.coli* BL21（DE3，pET28a-pgi）、*E.coli* BL21（DE3，pET20b-a6pe）以及 *E.coli* BL21（DE3，pET28a-a6pp）四种不同重组菌。分别挑取单菌落进行目的蛋白的诱导表达，当摇瓶内的重组菌扩大培养至 OD_{600} = 0.6~0.8 时，加入诱导剂 IPTG 进行诱导表达，IPTG 终浓度为 0.05~0.5 mmol/L。低温有利于提高蛋白的可溶性表达水平，因此将诱导温度设置为 16~18℃，诱导表达时间为 20 h。诱导结束后，于 4℃条件下高速离心收集菌体。使用 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体后进行超声破胞处理，收集破胞上清液。由于 Ni^{2+} 对 A6PE 有强烈抑制作用[119]，因此对重组 A6PE 破胞上清液采用热处理方式进行纯化，在 60℃的条件下孵育 20 min，孵育结束后 4℃高速离心，收集上清液，使用超滤管进行浓缩；按照方法 2.3.4 采用镍柱亲和层析法对重组 PPGK、PGI、A6PP 的破胞上清液进行蛋白纯化。使用 SDS-PAGE 凝胶电泳对纯化后的酶液进行验证，结果如图 2-5 所示。由电泳结果可知，重组 PPGK、PGI、A6PE、A6PP 均在各自对应的目的蛋白分子量处出现单一条带，表明实现了多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系用酶在大肠杆菌中的高效异源表达，且重组酶的纯化效果良好，可以用于后续的酶活表征及催化反应研究。

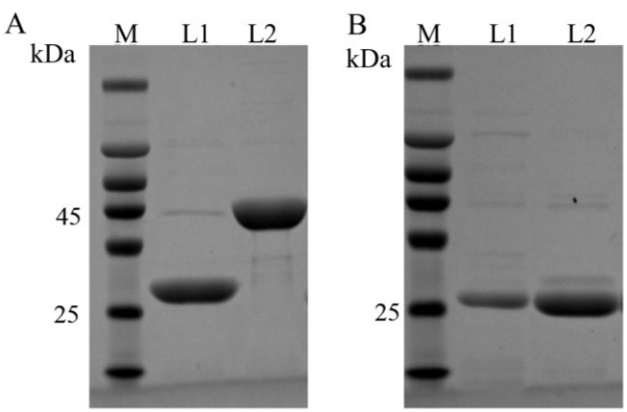

图 2-5 重组酶 SDS-PAGE 分析图。泳道 1：重组 PPGK、泳道 2：重组 PGI（A）；泳道 1：重组 A6PE、泳道 2：重组 A6PP（B）

Figure 2-5 SDS-PAGE analysis chart of four recombinant enzymes. Line 1: recombinant PPGK, Line 1: recombinant PGI (A); Line 1: recombinant A6PE, Line 2: recombinant A6PP (B)

将四种重组酶按照方法 2.3.5 分别测定酶活性，表 2-3 列举了四种重组酶的酶活信息，重组 PPGK 的比酶活为 48.39 U/mg，重组 PGI 的比酶活为 100.39 U/mg，重组 A6PE

的比酶活为 53.13 U/mg，重组 A6PP 的比酶活为 12.75 U/mg，说明制备的重组酶的酶活力较高。

表 2-3 四种重组酶的酶活力测定

Table 2-3 Enzyme activity assays of four recombinant enzymes

重组酶	酶活（U/mL）	蛋白含量（mg/mL）	比酶活（U/mg）
PPGK	54.42	1.12	48.39
PGI	126.50	1.26	100.39
A6PE	21.70	0.51	53.13
A6PP	13.51	1.06	12.75

2.4.4 重组 A6PP 酶学性质分析

由于 *C. thermocellum* A6PP 具体酶学性质还未见详细报道，因此本研究综合考察重组 A6PP 的最适温度、最适 pH、金属离子依赖性、热稳定性、储藏稳定性、底物特异性及酶动力学参数等酶学性质；通过同源建模及分子对接，构建 *C. thermocellum* A6PP 底物催化模型，预测该酶的底物结合位点关键氨基酸残基。

2.4.4.1 温度对重组 A6PP 酶活的影响

温度是影响酶活的主要因素之一，探究重组 A6PP 最适温度将对指导酶催化反应的过程具有重要意义。测定了重组 A6PP 纯酶液在不同温度（30~90ºC）条件下的相对催化活力，结果如图 2-6 所示，重组 A6PP 在 30~40℃温度范围内，表现出较低的相对酶活力，而当温度高于 40℃时，重组 A6PP 的酶活力显著增加，在 60℃时，重组 A6PP 的相对催化活性达到最高，而当温度进一步升高，高于 70℃后重组 A6PP 相对酶活急剧降低，在 90℃时重组 A6PP 基本丧失催化活力，这是因为温度会导致蛋白变性从而使酶活降低甚至彻底失去催化活性。综上所述，重组 A6PP 最适温度为 60℃。

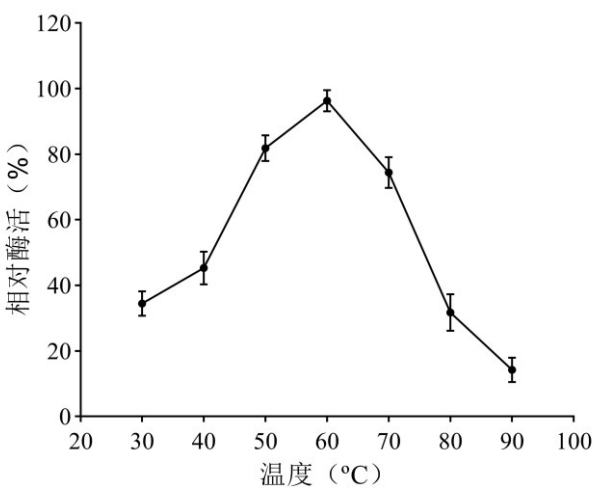

图 2-6 温度对重组 A6PP 酶活的影响

Figure 2-6 Effect of temperature on the activity of recombinant A6PP

2.4.4.2 pH 对重组 A6PP 酶活的影响

pH 可以通过影响酶活性中心与底物结合位点关键氨基酸残基的解离和蛋白表面电荷的改变，从而影响酶的催化活性。因此本研究选取不同缓冲液体系、不同 pH 测定重组 A6PP 的最适 pH，结果如图 2-7 所示。

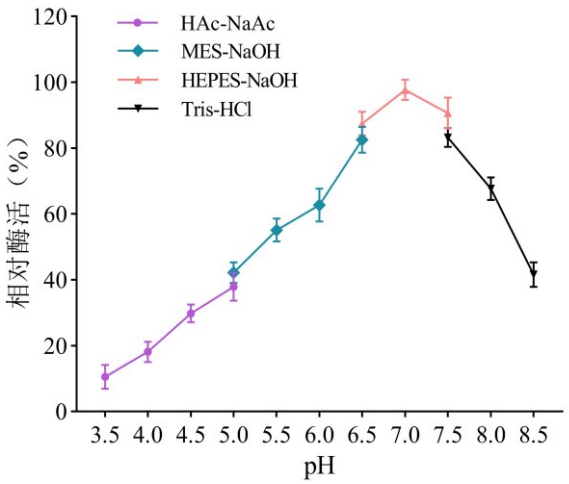

图 2-7 pH 对重组 A6PP 酶活的影响

Figure 2-7 Effect of pH on the activity recombinant A6PP

重组 A6PP 在 pH 7.0 的 HEPES-NaOH 缓冲体系中表现出最高的催化活性，在 pH 值为 6.0~8.0 的范围内，重组 A6PP 的相对酶活均高于 60%；当 pH 值低于 5.0 时，重组 A6PP 的相对酶活低于 40%，由结果可知重组 A6PP 的最适 pH 为 7.0。综合比较已报道的 HAD 家族磷酸酶的性质可知，重组 A6PP 与其他 HAD 家族磷酸酶性质类似，会在中性条件下表现出最高的活性，如来源于嗜好热玫瑰红球菌（*Thermomicrobium roseum* DSM 5159）的 HAD 磷酸酶 Trd_1070（最适 pH 7.0）[121]和提取于苹果叶片的山梨醇 6-磷酸磷酸酶（最适 pH 6.8）[122]。

2.4.4.3 金属离子对重组 A6PP 酶活的影响

由于金属离子会对酶催化反应产生一定影响，因此研究了不同金属二价离子对重组 A6PP 的影响，结果如图 2-8 所示，*C. thermocellum* A6PP 可以在未添加任何金属离子的情况下表现出一定的脱磷酸活性，说明该酶并不严格依赖金属离子。而与大多数 HAD 家族磷酸酶相同，重组 A6PP 也在 Mg^{2+}的参与下，表现出最高的催化活性，相比于未添加金属离子的对照组，其活性提高了约 10 倍。此外，Co^{2+}、Ni^{2+}、Mn^{2+}、Zn^{2+}等二价金属离子也可以在一定程度上提高重组 A6PP 的催化活性，而 Cu^{2+}、Fe^{2+}、Ca^{2+}等金属离子对重组 A6PP 的催化活性基本无显著性影响。综上所述，Mg^{2+}可以显著提高重组 A6PP 的活性。

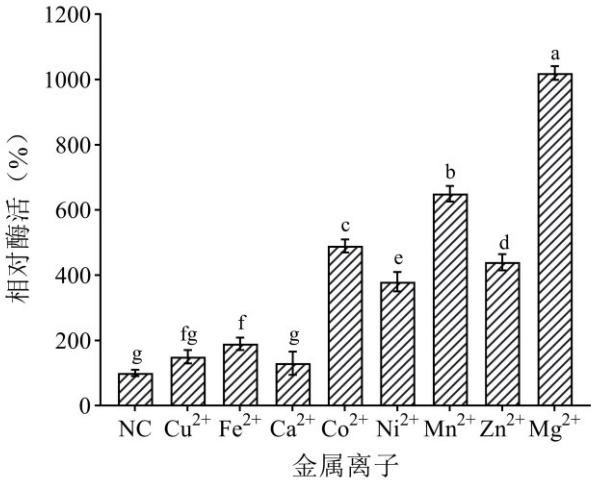

图 2-8 金属离子对重组 A6PP 酶活的影响

注：不同小写字母表示重组 A6PP 相对酶活有显著性差异（$p < 0.05$）

Figure 2-8 Effect of metal ions on the activity recombinant A6PP

Note: different lower-case letters indicated significant differences in the relative enzyme activities of recombinant A6PP ($p < 0.05$)

2.4.4.4 重组 A6PP 的热稳定性分析

酶的热稳定性是酶的重要性质之一，也是评判其是否能够适合应用于工业加工的指标之一。为考察重组 A6PP 的热稳定性，将重组 A6PP 纯酶液分别在 50、60、70℃下孵育 30~180 min，每隔 30 min 取样，迅速冷却后测定其残留活力。结果如图 2-9 所示，在 50℃下孵育 180 min，重组 A6PP 残留活性始终能保持在 80%左右，在 60℃时孵育 120 min，重组 A6PP 的残留活性仍保持在 70%以上，而在 70ºC 保温 150 min，仍剩余 50%的酶活，实验结果说明重组 A6PP 具有较好的热稳定性，这也与其基因来源于嗜热菌有关，*C. thermocellum* ATCC 27405 是一种高温厌氧细菌，据报道来源于该菌属的热内切 β-1, 4-葡聚糖酶也具有良好的热稳定性[123]。较好的耐热性可延长酶的半衰期，提高反应温度，避免常温状态下的微生物污染，因此重组 A6PP 具有较好的应用前景。

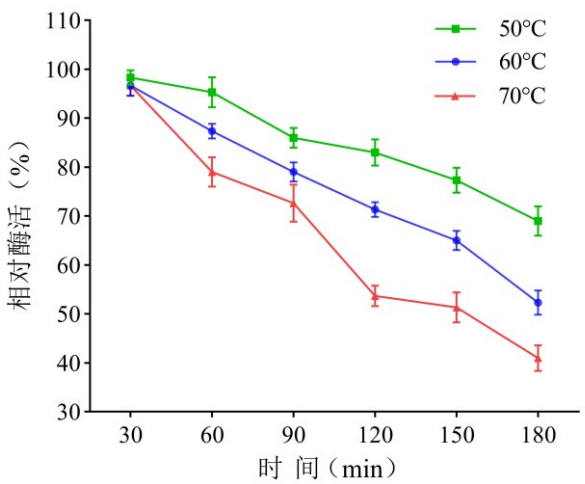

图 2-9 重组 A6PP 的热稳定性

Figure 2-9 The thermostability of recombinant A6PP

2.4.4.5 重组 A6PP 的储藏稳定性分析

酶制剂的储藏稳定性也是酶生产应用能力的重要指标之一，为测定重组 A6PP 的储藏稳定性，将重组 A6PP 酶液置于 4℃环境中，分别于第 0，5，10，15，20，25 d 测定低温储藏状态下重组 A6PP 酶的活性，重组 A6PP 的储藏稳定性如图 2-10 所示。重组 A6PP 在第 5 d 的残余酶活略高于 50%，第 10 d 时，重组 A6PP 的残余酶活不足 35%，第 15 d 时，重组 A6PP 的残余酶活不足 10%，到第 20 d 时，重组 A6PP 完全丧失催化活性。这是由于游离的酶易受环境影响，容易失去催化活性，而添加甘油、金属离子等稳定剂成分可提高酶制剂的储藏稳定性[124,125]。在后续研究中可以探讨添加多元醇、金属离子等稳定剂对于重组 A6PP 的储藏稳定性的影响，以提高酶制剂的储藏性能。

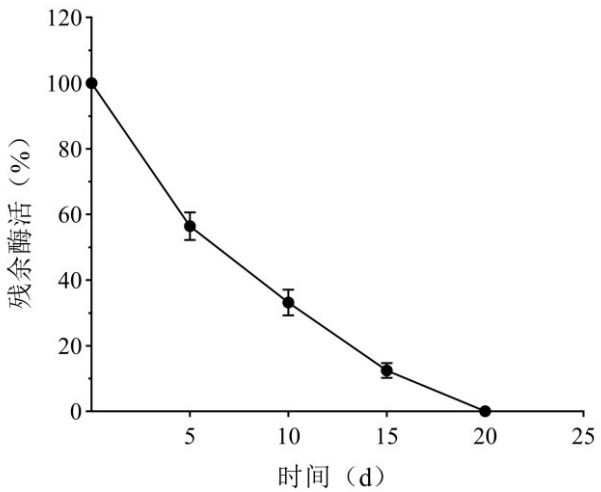

图 2-10 重组 A6PP 储藏稳定性

Figure 2-10 Storage stability of recombinant A6PP

2.4.4.6 重组 A6PP 底物特异性研究分析

大多数 HAD 家族磷酸酶都表现出极高的底物多样性，Huang 等人[126]通过对 200 多种 HAD 家族磷酸酶进行了活性谱的检测，结果表明，接近 150 余种的 HAD 家族磷酸酶能利用 5 种以上的底物，这种底物多样性有助于避免细胞中含磷化合物的积累，促进细胞中代谢含磷化合物。而在体外多酶级联反应中则希望磷酸酶能有较高的底物专一性，避免副产物的大量产生，因此对重组 A6PP 对不同磷酸化底物的去磷酸化进行研究，分别以 5.0 mmol/L 的 G1P、G6P、F6P 和 A6P 为底物按方法 2.3.5.6 进行反应，空白组不加任何底物，通过孔雀石绿法检测体系中释放的无机磷酸，显色反应在没有游离磷酸基团存在时呈黄色，而当体系中存在游离的磷酸基团时则呈现绿色，且颜色越深表示体系中的游离无机磷酸盐含量越高，即重组 A6PP 催化底物脱去磷酸基团的量越多，重组 A6PP 的不同底物去磷酸化反应结果研究结果见图 2-11。与对照组相比，重组 A6PP 无法以 G1P 为底物进行催化反应，但对 G6P，F6P，A6P 都有一定的亲和力，但是重组 A6PP 对不同的底物催化活性不同，因此需要进一步测定重组 A6PP 对不同底物的酶动力学参数。

图 2-11 重组 A6PP 不同底物去磷酸化反应结果

注：从左到右依次是空白、G1P、G6P、F6P、A6P

Figure 2-11 The results of recombinant A6PP for dephosphorylation reaction with different substrates

Note: from left to right: negative control, G1P, G6P, F6P, A6P

表 2-4 重组 A6PP 动力学参数

Table 2-4 The kinetic parameters of recombinant A6PP

底物	K_m（mmol/L）	k_{cat}（s^{-1}）	k_{cat}/K_m（$mmol/L^{-1}\ s^{-1}$）
G1P	0	0	0
G6P	3.96	24.30	6.14
F6P	2.95	29.10	9.86
A6P	1.78	36.40	20.45

计算重组 A6PP 在不同底物条件下的最大反应速度（V_{max}）和米氏常数（K_m），可推算出重组 A6PP 反应的催化常数（k_{cat}）和催化效率值（k_{cat}/K_m）。重组 A6PP 的动力学参数如表 2-4 所示。其中，以 A6P 为底物时的 K_m 和 k_{cat}/K_m 分别为 1.78 mmol/L、20.45 $mmol/L^{-1}\ s^{-1}$，底物与酶的亲和力强弱可以通过 K_m 值的大小进行判断，重组 A6PP 对 A6P 的 K_m 值最小，说明在上述几种磷酸化底物中，重组 A6PP 对阿洛酮糖 6-磷酸的亲和性最佳。同时重组 A6PP 在以 A6P 为底物时，其 k_{cat}/K_m 值，远高于以 F6P 和以 G6P 的催化速率。综上，在以 D-葡萄糖为底物的多酶级联催化合成 D-阿洛酮糖体系中，重组 A6PP 相较于 G6P 和 F6P 等中间磷酸盐代谢产物，更倾向于脱去 A6P 的磷酸基团，这种催化特性将有利于级联催化体系合成 D-阿洛酮糖。

2.4.4.7 *C. thermocellum* A6PP 底物催化模型

高度保守的 α/β 结构域是 HAD 家族磷酸酶的蛋白结构共有特征，在该保守域中包含了磷酰转移位点和决定底物特异性的“Cap”结构[127]，磷酸水解酶的催化作用是通过在“Cap”结构域中形成的天冬氨酸中间体实现[128,129]。本研究构建了 *C. thermocellum* A6PP 底物催化模型，预测了底物结合位点关键氨基酸残基。首先采用 AlphaFold2 对 *C. thermocellum* A6PP 进行三维结构模型预测，其次使用 Schrödinger 软件对蛋白结构分子能量最小化后，与底物进行分子对接。参考 ChS6PP 底物结合模型分析（PDB ID: 1RDF）[130]，将 Mg^{2+}定义在三个天冬氨酸 Asp10、Asp168 及 Asp172 之间，并与这三个天冬氨酸残基形成了配位键，进一步采用 SP-docking 对 *C. thermocellum* A6PP 蛋白与底物 D-阿洛酮糖 6-磷酸进行分子对接模拟，结果如图 2-12 所示。其中 *C. thermocellum* A6PP 中的关键氨基酸残基显示为蓝色棒状，底物 A6P 为绿色（其中磷酸基团为棕黄色）；

Mg^{2+}通过配位键与底物分子 A6P 结合，A6P 分子周围的氨基酸残基形成的疏水口袋，可认为是底物的识别位点；Glu195、Thr170 和磷酸基团之间形成氢键，有助于蛋白分子与底物的磷酸基团之间的稳定结合。

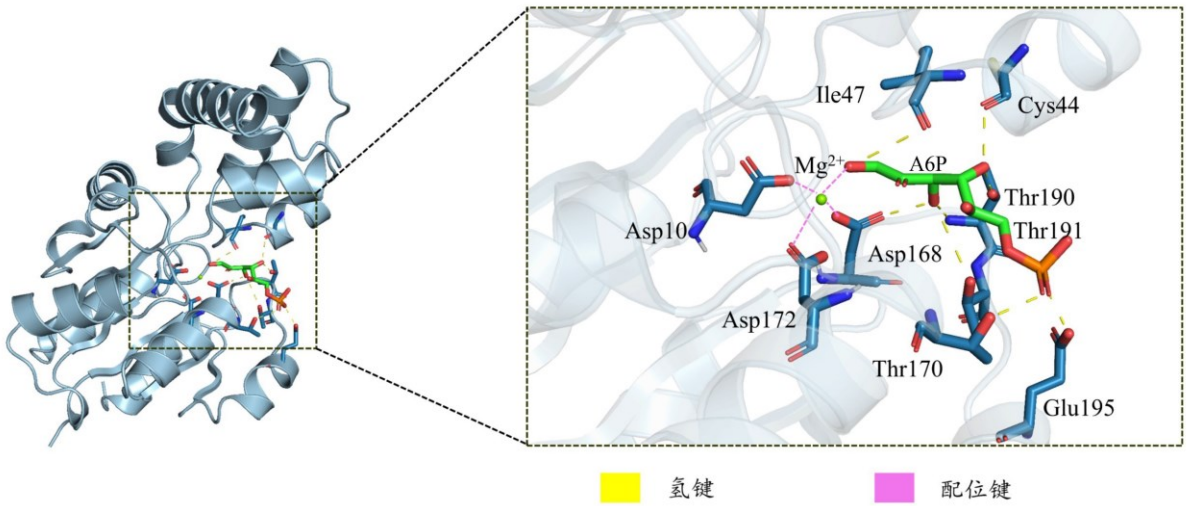

图 2-12 *C. thermocellum* A6PP 底物对接模型及关键氨基酸位点预测

Figure 2-12 The prediction of *C. thermocellum* A6PP substrate docking model and key amino acid sites

2.4.5 重组酶适配性分析

由于体外多酶级联体系要求所使用的酶元件的反应温度、最适 pH、以及金属离子依赖性等酶学性质相适配，从而保证多酶级联反应能正向进行。本研究对重组 PPGK、重组 PGI 以及重组 A6PE 的最适温度、pH、最适金属离子进行了探讨，以确定多酶级联催化 D-葡萄糖合成 D-阿洛酮糖体系中各酶的适配性，具体的结果见图 2-13，级联体系中各酶在 50~70℃温度范围内表现出较好的催化活性，能适应在高温条件下的反应；各酶的最适 pH 基本为中性或弱碱性，说明重组酶在级联反应体系中能相互兼容；此外 Mg^{2+}能作为级联反应中重组酶的激活剂，提高重组酶的催化活性，表 2-5 列举了四种重组酶的基本酶学性质。综上所述，该多酶级联体系中各酶具有良好的适配性，有利于级联反应的持续进行。

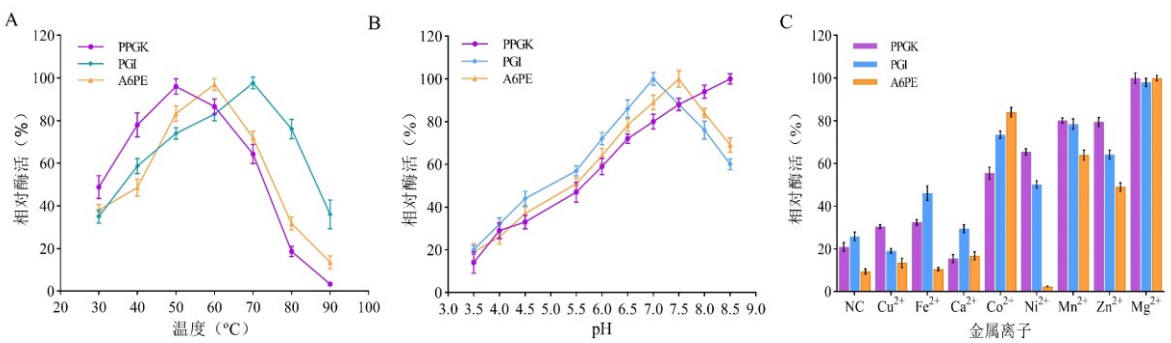

图 2-13 重组 PPGK、PGI、A6PE 的最适温度（A）、最适 pH（B）和最适金属离子（C）

Figure 2-13 Optimum temperature (A), optimum pH (B) and optimum metal ion (C) for recombinant PPGK, PGI and A6PE

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/298072140106006041