

# 甘油激酶的表达纯化及在酮糖合成中的应用

吴晓茹, 李子杰, 中西秀树, 高晓冬\*

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 研究了大肠杆菌 MG1655 来源的甘油激酶(GK)的表达及其在酮糖合成中的应用。本研究从大肠杆菌 MG1655 扩增了甘油激酶的基因片段 *glpK*, 连接到表达载体 pET-28a 上, 在大肠杆菌 Rosetta(DE3)中进行 IPTG 诱导表达, 利用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱纯化目的蛋白。利用该甘油激酶可以催化成本较低的底物甘油生成 L-3-磷酸甘油, 再经过磷酸甘油氧化酶(GPO)的催化生成磷酸二羟基丙酮(DHAP), 生成的 DHAP 可以在不同的 DHAP 依赖性醛缩酶的催化下与受体 D-甘油醛合成酮糖-1-磷酸, 最终用酸性磷酸酶脱掉磷酸生成一系列酮糖。结果表明, 该酶成功地用于“一釜多酶法”合成体系中, 以便宜的底物甘油为前体, 合成出包括稀有糖在内的一系列酮糖, 生成的产物、产率及比例用 TLC、HPLC 进行检测。该方法的建立将为其其他稀有糖及其衍生物的合成提供理论依据。

**关键词:** 甘油激酶; 醛缩酶; 磷酸二羟基丙酮; 一釜多酶法; 酮糖

**中图分类号:** Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)08-0817-07

## Expression and Purification of Glycerol Kinase and Its Application for Ketose Synthesis

WU Xiaoru, LI Zijie, NAKANISHI Hideki, GAO Xiaodong\*

(School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** In this paper, the expression of glycerol kinase (GK) from *Escherichia coli* MG1655 and its application for ketose synthesis were investigated. The gene *glpK* encoding GK was amplified and cloned into the expression plasmid pET-28a. The recombinant plasmid was transformed into the *E. coli* Rosetta (DE3) to express the protein induced by IPTG. GK enzyme was purified by  $\text{Ni}^{2+}$  chelating affinity column chromatography. The GK enzyme can catalyze cheap substrate glycerol to produce L-glycerol 3-phosphate which is converted into DHAP by glycerol phosphate oxidase (GPO). The generated DHAP can be coupled with the acceptor D-glyceraldehyde catalyzed by different DHAP-dependent aldolases to produce ketose-1-phosphate, which can be dephosphorylated with acid phosphatase (AP) to get a series of ketoses. The results demonstrated that a series of

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(21302069); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(1014130201120540); 中国博士后科学基金项目(2014M551500)。

\* 通信作者: 高晓冬(1965—), 男, 浙江乌镇人, 农学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事细胞分子生物学, 生物化学, 糖生物学等的研究。E-mail: xdgao@jiangnan.edu.cn

引用本文: 吴晓茹, 李子杰, 中西秀树, 等. 甘油激酶的表达纯化及在酮糖合成中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(08): 817-823.

ketoses including rare sugars were successfully synthesized using one-pot multienzymatic reaction with the cheap substrate glycerol as the precursor. The product yields and ratios were detected by TLC and HPLC. This approach could provide the theory basis for the synthesis of more other rare sugars and their derivatives.

**Keywords:** glycerol kinase, aldolase, dihydroxyacetone phosphate, one-pot multienzymatic reaction, ketose

稀有糖的定义是自然界中存在但含量很低的单糖及其衍生物<sup>[1]</sup>,单糖中如 D-阿洛酮糖、D-山梨糖在自然界中含量稀少,属于稀有糖范畴。单糖衍生物中包括各种单糖对应的糖醇(如木糖醇、山梨糖醇)、环醇、去氧糖(如鼠李糖、岩藻糖)、氨基糖(如葡萄糖胺)、分支碳链糖(如 D-芹菜糖)等<sup>[2]</sup>。稀有糖有很多用途,既可以作为食品添加剂改善其理化性质,还可以作为前体物质来合成具有生物活性的产物,因此稀有糖在食品、医药和保健等领域有很大的潜在应用<sup>[3-4]</sup>,如 D-阿洛酮糖具有保护胰腺  $\beta$  岛细胞、改善胰岛素敏感度和葡萄糖耐受性、减少腹部脂肪积累、清除活性氧自由基等作用,是一种很有前途的无能量的功能性甜味剂<sup>[5]</sup>,但是目前大部分稀有糖的合成路线仍然有限,并且大多以较昂贵的前体物质进行合成,导致稀有糖的价格还是很高。

在醛缩酶家族中,磷酸二羟基丙酮(dihydroxyacetone phosphate, DHAP)依赖型醛缩酶的应用最为广泛<sup>[6-7]</sup>。该类醛缩酶能催化供体 DHAP 与受体醛进行缩合反应,生成的产物有两个新的立体中心,并且一般是由醛缩酶决定立体中心的构型,而不依赖于底物的结构<sup>[8]</sup>。该类醛缩酶虽然可以接受多种醛分子作为受体,但对供体分子 DHAP 具有很严格的专一性<sup>[9]</sup>。由于 DHAP 的价格昂贵且不稳定,很大程度上限制了该酶类大规模的合成应用<sup>[10]</sup>。目前,最具有应用前景的是将 DHAP 的酶法合成与醛缩酶催化的缩合反应偶联。DHAP 的酶法合成主要途径如下:一种是在氧气存在下,磷酸甘油氧化酶(GPO)氧化 L-3-磷酸甘油生成 DHAP;另一种是利用甘油激酶或者二羟基丙酮激酶,以二羟基丙酮为底物,ATP 为辅助因子来生成 DHAP;还有一种就是甘油首先被甘油激酶(glycerol kinase, GK)磷酸化生成 L-3-磷酸甘油,进而被 GPO 氧化为 DHAP。Fessner 等人首次建立了“一釜合成法”:首先在氧气的存在

下 L-3-磷酸甘油被 GPO 氧化为 DHAP,然后在醛缩酶的催化下,生成的 DHAP 与醛受体进行缩合反应得到酮糖-1-磷酸,最后在酸性磷酸酶作用下脱去磷酸基团,得到目标糖化合物<sup>[11]</sup>。在 Israel 等人的工作中,用二羟基丙酮作为底物,以 ATP 为辅因子,在二羟基丙酮激酶的作用下生成 DHAP,同时在乙酸激酶的催化乙酰磷酸实现 ATP 的再循环,在 FucA 醛缩酶的催化下 DHAP 与各种醛进行缩合反应,所有的反应都在“一釜”里进行<sup>[12]</sup>。

本研究旨在利用“一釜多酶法”合成策略,进一步降低成本(用便宜的底物代替 L-3-磷酸甘油)。本论文中用到的甘油激酶可以催化甘油反应生成 L-3-磷酸甘油,在反应中要有  $Mg^{2+}$  和 ATP 的参与<sup>[13]</sup>。GK 酶是甘油代谢过程中的限速酶,1,6-二磷酸果糖(FBP)会抑制该酶的活性<sup>[14]</sup>。GK 是一种常见的酶,可以从不同生物组织中提取得到,目前主要是从大肠杆菌和嗜热脂肪芽胞杆菌中发酵生产<sup>[15]</sup>。血清中甘油三酯的含量是临床上诊断心血管疾病的重要指标,甘油激酶是酶法测定血液中甘油三酯的关键酶之一<sup>[16]</sup>。

基于本实验室前期利用 GPO 纯酶结合 DHAP 依赖型醛缩酶采用“一釜四酶法”合成稀有糖的基础<sup>[17-21]</sup>,本论文中为了进一步降低成本,以甘油作为底物,把甘油激酶用于“一釜多酶法”体系合成包括稀有糖在内的一系列酮糖。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

**1.1.1 质粒和菌株** 大肠杆菌 MG1655、DH5 $\alpha$  和 Rosetta(DE3)本实验室保存。菌株 BL21/pET28a-*rhaD*、BL21/pET28a-*fda*、BL21/pET28a-*fucA*、Rosetta/pET43a-*rhaD*、Rosetta/pET28a-*glpO* 为实验室前期构建<sup>[17-21]</sup>。Rosetta/pET28a-*glpK* 为本实验所构建。用于基因扩增的引物在华大基因合成。

**1.1.2 酶、试剂及耗材** 限制性内切酶、DNA 连接酶及 KOD DNA 聚合酶购于 TaKaRa 公司(大连);咪唑购于上海生工;甘油、D-果糖、腺苷-5'-三磷酸二钠盐(ATP)购于国药集团化学试剂有限公司;D-甘油醛(D-glyceraldehyde)购于上海相辉医药科技有限公司;过氧化氢酶(catalase)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素、D-阿洛酮糖(D-psicose)、D-山梨糖(D-sorbose)、酸性磷酸酶(acid phosphatase from sweet potato, AP) 购于 Sigma-Aldrich;黄素腺嘌呤二核苷酸二钠盐水合物购于阿拉丁;Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱购于 GE;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(加强型)购于碧云天(南通);氧气购于新南气体;Aminex HPX-87H 色谱柱(300×7.8 mm)购于 Bio-Rad 公司;TLC 硅胶铝板购于青岛海洋化工。

**1.1.3 培养基及其他溶液配制** YT 培养基:胰蛋白胨(tryptone)16 g/L,酵母抽提物(yeast extract)10 g/L,氯化钠(NaCl)5 g/L,琼脂(agar)20 g/L(固体培养基),湿热灭菌(121 °C, 20 min)。

TB 培养基:1.2%(W/V) 胰蛋白胨(tryptone), 2.4%(W/V) 酵母抽提物(yeast extract), 0.4%(V/V) 甘油, 磷酸盐缓冲液为 17 mM 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 72 mM 磷酸氢二钾(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 湿热灭菌(121 °C, 20 min)。

用于蛋白纯化缓冲液:裂解细胞、平衡缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl;洗涤缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 60 mmol/L 咪唑;洗脱缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑;脱盐透析缓冲液为 25 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 50 mmol/L NaCl。

**1.1.4 主要仪器** 超声破碎仪(南京新辰生物科技有限公司);高效液相色谱仪(日立);蛋白纯化系统 AVANT(AKTA);iMark 酶标仪(Bio-Rad)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 表达载体 pET28a-*glpK* 的构建** 用 KOD 聚合酶进行 PCR 时,以大肠杆菌 MG1655 菌液为模板,以 *glpK*-F:5'-CCGGGAATTCATGACTGAAAAAATATATCGTTG-3' (*EcoR* I) 为上游引物。以 *glpK* -R:5'-CCCAAGCTTTTATTCGTCGTGTTCTTCC-3' (*Hind* III) 为下游引物,来扩增基因 *glpK*。使用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 分别对 *glpK* 基因片段和 pET-28a 质粒进行双酶切,经 DNA 连接酶连

接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 并涂布到 YT 卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)抗性平板上。挑选单菌落进行 PCR 鉴定,并提取质粒酶切鉴定,将筛选到的阳性转化子送至上海华大基因测序,从而得到正确编码的表达载体 pET28a-*glpK*。

**1.2.2 甘油激酶在大肠杆菌中的诱导表达** 将重组质粒 pET28a-*glpK* 转化到 Rosetta(DE3)感受态细胞中,转化步骤同上,涂布到 YT(卡那霉素)平板上,37 °C 过夜培养,然后挑取其中一个单菌落接种到 LB(卡那霉素)液体培养基中,37 °C 过夜培养,取 5 mL 菌液接种到 500 mL TB(卡那霉素)液体培养基中(1:100),37 °C 振荡培养,约 3~4 h 后,转至 16 °C 培养(降温),当菌体长到 OD<sub>600</sub> 约为 0.8 时,进行 IPTG 诱导表达(取样 100  $\mu$ L 作为诱导前样品进行 SDS-PAGE 检测),然后加入 500  $\mu$ L IPTG(浓度为 100 mmol/L,终浓度为 0.1 mmol/L)诱导,在 16 °C 培养 20 h 后(取样 100  $\mu$ L 作为诱导后样品用来 SDS-PAGE 检测),离心收集菌体(8 000 g, 2 min, 4 °C)。

**1.2.3 甘油激酶的分离纯化** 向收集的菌体中加入 20 mL 预冷的裂解液重悬细胞,置于冰上进行超声破碎,破碎约 30 min(破碎 5 s,间隔 5 s)后,显微镜观察细胞,直至破碎完成。将破碎好的菌体 4 °C 12 000 g 离心 30 min,将上清液移到新的离心管中,利用该上清液来纯化目的蛋白(上清液用来 SDS-PAGE 检测),使用蛋白纯化系统 AVANT(AKTA)用镍亲和层析柱来纯化目的蛋白。首先,用平衡缓冲液平衡镍亲和层析柱(5 mL HisTrp™ HP),然后上清液以 1.5 mL/min 的流速流过镍柱,上样完毕后,用洗涤缓冲液洗去非特异性结合的杂蛋白,最后使用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白,收集洗脱峰取样并进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 检测后剩余样品用透析袋(国药集团化学试剂有限公司)透析以除去高浓度的咪唑,将透析好的目的蛋白用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。

**1.2.4 醛缩酶以及磷酸甘油氧化酶的表达和纯化** 利用本实验室所保存的质粒,在大肠杆菌中表达纯化来源于大肠杆菌和海栖热孢菌的 L-鼠李树胶糖-1-磷酸醛缩酶 RhaD、来源于嗜热栖热菌的 L-墨角藻糖-1-磷酸醛缩酶 FucA、来源于肉质葡萄球菌 D-果糖-1,6-二磷酸醛缩酶 FruA 和来源于肺炎链球菌的磷酸甘油氧化酶 GPO<sup>[17-21]</sup>。



**1.2.5 利用不同醛缩酶进行一系列酮糖的合成**以甘油为前体,用“一釜多酶法”合成策略,进行一系列酮糖的合成。反应体系如下 (1 mL):ATP(400 mmol/L,10  $\mu$ L,4.0 mmol/L),MgCl<sub>2</sub> (200 mmol/L,10  $\mu$ L,2 mmol/L),甘油(1 mol/L,25  $\mu$ L,25 mmol/L),D-甘油醛(0.5 mol/L,50  $\mu$ L,25 mmol/L),GK 酶(终质量浓度为 0.5 mg/mL),磷酸甘油氧化酶 GPO(终质量浓度为 0.2 mg/mL),过氧化氢酶(1 000 U,0.2  $\mu$ L),FAD (68.7 mmol/L,0.2  $\mu$ L,13.7  $\mu$ mol/L),醛缩酶(RhaD<sub>E.coli</sub>、FruA、FucA、RhaD<sub>T.muri</sub>)(终质量浓度为 0.5 mg/mL),补加 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)缓冲液使反应总体积为 1 mL<sup>[22]</sup>。反应在 50 mL 的离心管内进行,加入氧气至饱和,然后盖上橡胶塞,插入注射器针头连接一个充氧气的气球。

反应液在 30  $^{\circ}$ C 下轻摇反应约 12 h,取 1  $\mu$ L 反应液通过 TLC 来检测(展开剂为正丁醇:乙酸:水=2:1:1(V:V:V),并使用茴香醛染液进行染色。反应结束后,向反应液中加入 6 mol/L HCl 调 pH 为 4.6,然后加入 1.2  $\mu$ L AP,在 37  $^{\circ}$ C 轻摇反应 12 h,用 TLC 来监测反应(展开剂为正丁醇:乙酸:水=2:1:1(V:V:V),反应完全后,用 1 mol/L NaOH 将 pH 调整到 7.0。

用 HPLC 来检测酮糖的合成、产率及比例。HPLC 检测条件如下:流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,流速为 0.5 mL/min,柱温为 60  $^{\circ}$ C,示差检测器检测,进样量为 20  $\mu$ L。采用相同的 HPLC 工作条件进行和 D-果糖、D-山梨糖、D-阿洛酮糖标准曲线的绘制。

## 2 结果与分析

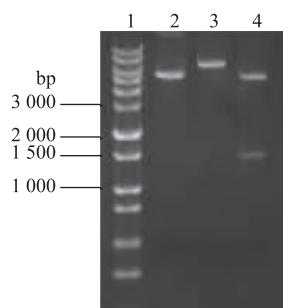
### 2.1 甘油激酶基因的 PCR 扩增、克隆及鉴定

以大肠杆菌 MG1655 菌液为模板,扩增出一条约 1 509 bp 的条带,与预期的扩增产物大小吻合。按照 1.2.1 节方法构建重组质粒 pET28a-*glpK*,重组质粒进行酶切验证,分别用 *EcoR* I 单酶切质粒 pET-28a 和重组质粒 pET28a-*glpK*,用 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切重组质粒 pET28a-*glpK*,双酶切重组质粒得到两个片段,其中大片段与线性 pET-28a 大小相当,1 500 bp 处有一条带与 *glpK* 基因大小相同,表明重组质粒构建成功,见图 1,测序结果与基因序列完全相同。

### 2.2 甘油激酶在大肠杆菌中的表达和纯化

根据图 2,SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果显示,经 IPTG 诱导后菌体蛋白在约 56 kDa 处出现一条

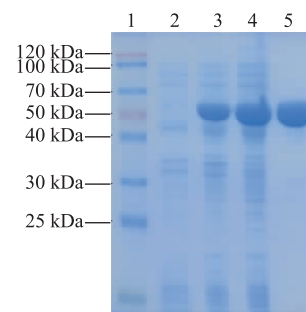
蛋白条带(泳道 3),与预计大小吻合,未经 IPTG 诱导的菌体(泳道 2)没有此条带,说明重组蛋白 GK 成功表达。同时菌体裂解上清出现清晰的目的蛋白条带(泳道 4),表明重组蛋白 GK 以可溶性蛋白形式存在。经 Ni<sup>2+</sup>柱纯化后的蛋白(泳道 5),纯度可达 90%以上,基本无杂质。从而表明该蛋白可以成功地在上述中表达和纯化。



1-DNA marker;2-质粒 pET-28a 经 *EcoR* I 单酶切产物;3-重组质粒 pET28a-*glpK* 经 *EcoR* I 单酶切产物;4-重组质粒 pET28a-*glpK* 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物

图 1 重组质粒 pET28a-*glpK* 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzymatic analysis of recombinant plasmid pET28a-*glpK*



1-蛋白 marker;2-诱导前全细胞;3-诱导 20 h 后的全细胞;4-细胞裂解液上清;5-纯化后的 GK

图 2 SDS-PAGE 检测 GK 的表达与纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of GK expression and purification

### 2.3 TLC 检测以甘油为前体的“一釜多酶法”反应

以甘油和 D-甘油醛为底物,以 ATP 为辅助因子,在反应体系中加入 GK、GPO 和不同的醛缩酶 RhaD<sub>E.coli</sub>、RhaD<sub>T.muri</sub>、FucA、FruA 进行反应,反应过程示意如图 3 所示。图 4 为用 TLC 检测的结果,从图 4 (a-d) 结果可以看出 GK 酶是可以催化甘油生成 L-3-磷酸甘油,同时 ATP 变为 ADP(用绿色箭头标出),然后在 GPO 和醛缩酶的作用下生成产物,生成的产物用展开剂展层并用茴香醛染液染色后,能够

检测到酮糖-1-磷酸的生成,在 TLC 板上显示深靛蓝色,图中用红色箭头标出,调节 pH 值到 4.7,加入酸性磷酸酶后,比较 AP 加入前后,可以发现酮糖-

1-磷酸被脱掉磷酸生成新的物质酮糖,酮糖用黑色箭头标出,同时 ADP 变为 AMP(用蓝色箭头标出)。

## 2.4 HPLC 检测及比例测定

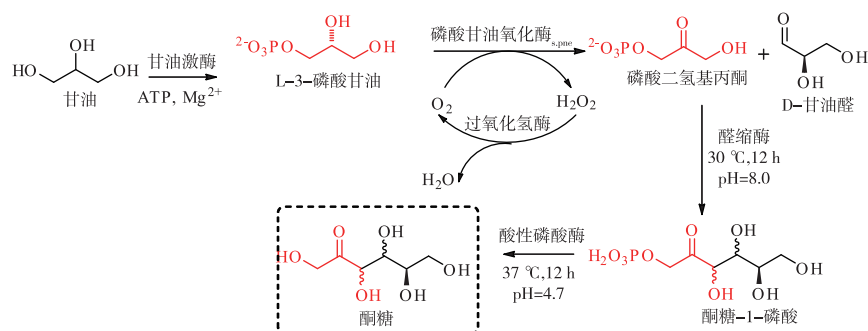
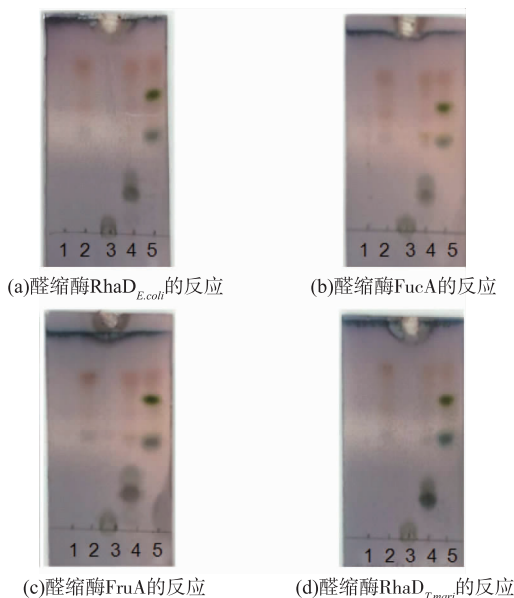


图3 以甘油作为起始底物通过“一釜多酶法”合成酮糖

Fig. 3 One-pot multienzymatic synthesis of ketoses with the substrate glycerol

为了进一步确定得到的产物,反应液用 HPLC 进行检测,并用 D-山梨糖、D-阿洛酮糖和 D-果糖标准品溶液,采用相同的 HPLC 检测条件,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

期结果一致,同时生成了稀有糖 D-阿洛酮糖和 D-山梨糖,通过 HPLC 分别测得 D-阿洛酮糖的质量浓度为 0.26 mg/mL, D-山梨糖的质量浓度为 0.20 mg/mL, 比例为 D-阿洛酮糖/D-山梨糖=1.3/1, 产量为 0.46 mg, 产率为 64%(见液相图 5(a)和表 1)(甘油和 D-甘油醛相对于 ATP 来说是过量的,产率根据 ATP 的量计算,理论产生 0.72 mg 糖类)。为了验证 GK 酶与其他的 DHAP 依赖型醛缩酶是否可以偶联反应生成不同的产物(酮糖),在相同的反应条件下,将 GK 酶分别与 FucA、FruA 和 RhaD<sub>T.mari</sub> 应用于“一釜多酶法”合成体系中。结果表明,当醛缩酶为 FucA 以 D-甘油醛为受体时,可以得到 D-阿洛酮糖/D-山梨糖的比例约为 0.4/1, 质量浓度分别为 0.09 mg/mL 和 0.25 mg/mL, 产量为 0.34 mg, 产率为 47%(见液相图 5(b)和表 1);利用 FruA 醛缩酶,以 D-甘油醛作为受体,通过 HPLC 检测其只生成 D-果糖,说明 FruA 生成的产物具有很好的专一性,质量浓度为 0.53 mg/mL, 产率为 74%(见液相图 5(c)和表 1);利用 RhaD<sub>T.mari</sub>, 以 D-甘油醛作为受体,通过 HPLC 测得 D-阿洛酮糖/D-山梨糖的比例约为 9/1, 质量浓度分别为 0.47 mg/mL 和 0.05 mg/mL, 产量为 0.52 mg, 产率为 72%(见液相图 5(d)和表 1)。由此可知大肠杆菌来源的 GK 可以用甘油做底物,应用于“一釜多酶法”酮糖合成体系中,并且具有较高的活性,为该法进一步用于其他酮糖(如塔格糖等)及其衍生物的合成提供依据。



1-甘油;2-D-甘油醛;3-ATP;4-脱磷酸前产物;5-脱磷酸后产物(加 AP, 酮糖生成);红色箭头指酮糖-1-磷酸产物,绿色箭头为 ADP,黑色箭头为酮糖产物,蓝色箭头为 AMP

图4 TLC 分析酮糖的生成

Fig. 4 TLC analysis of ketose synthesis

用甘油作为底物,首先利用 GK、GPO 和 RhaD<sub>E.coli</sub> 醛缩酶,以 D-甘油醛为受体进行酮糖的合成。与前

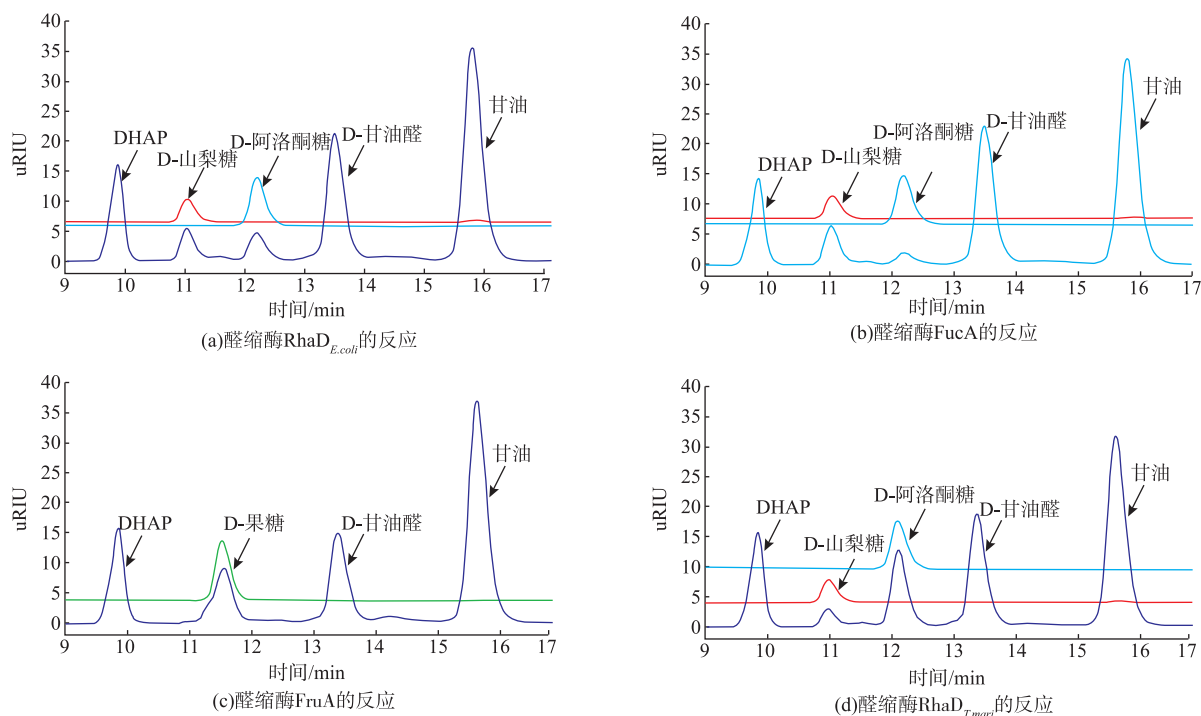


图 5 HPLC 分析酮糖的生成、比例及产率

Fig. 5 HPLC analysis of ketoses synthesis

表 1 GK 酶与不同醛缩酶的催化反应汇总表

Table 1 Summary of GK and aldolases catalyzed reactions

| 体系中的酶                         | 起始物    | 醛受体   | 产物           | 产率/% | 比例    |
|-------------------------------|--------|-------|--------------|------|-------|
| GK、GPO、RhaD <sub>E.coli</sub> | 甘油、ATP | D-甘油醛 | D-阿洛酮糖 D-山梨糖 | 64   | 1.3/1 |
| GK、GPO、FucA                   | 甘油、ATP | D-甘油醛 | D-阿洛酮糖 D-山梨糖 | 47   | 0.4/1 |
| GK、GPO、FruA                   | 甘油、ATP | D-甘油醛 | D-果糖         | 74   | 1/0   |
| GK、GPO、RhaD <sub>T.mari</sub> | 甘油、ATP | D-甘油醛 | D-阿洛酮糖 D-山梨糖 | 72   | 9/1   |

### 3 结 语

本研究成功地在 大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中表达、纯化了 GK 酶。在实验室前期工作的基础上,为避免在羟醛缩合反应中直接使用昂贵且不稳定的

底物 DHAP, 以便宜的底物甘油作为前体物质, 将 GK 成功应用于稀有糖的“一釜多酶法”合成中, 并且具有较高产率, 但仍需进一步降低成本, 稀有糖的大量合成还有待于投入到真正的产业化研究中。

### 参考文献:

- [1] OH D K, KIM N H, KIM H J, et al. D-Psicose production from d-fructose using an isolated strain, *Sinorhizobium* sp [J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2007, 23(4): 559-563.
- [2] LUO Xitao, CUI Jing, ZHOU Juan, et al. Recent advanced in the strategy for synthesis of rare monosaccharides and derivate sugar alcohol[J]. **China Food Additives**, 2014, 8: 150-157. (in Chinese)
- [3] POONPERM W, TAKATA G, ANDO Y, et al. Efficient conversion of allitol to D-psicose by *Bacillus pallidus* Y25 [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2007, 103(3): 282-285.
- [4] ALAJARIN R, GARCIA J E, WONG C H. A short enzymic synthesis of L-glucose from dihydroxyacetone phosphate and L-glyceraldehyde[J]. **The Journal of Organic Chemistry**, 1995, 60(13): 4294-4295.
- [5] FENG Zaiping, GONG Huiling, YUAN Huijun, et al. Advances on characterizations and biotransformation of D-allose [J]. **Food**

- and Fermentation Industries**, 2015, 41(6):227-233. (in Chinese)
- [6] ITURRATE L, SANCHEZ M I, OROZ G I, et al. Preparation and characterization of a bifunctional aldolase/kinase enzyme; a more efficient biocatalyst for C-C bond formation[J]. **Chemistry—A European Journal**, 2010, 16(13):4018-4030.
- [7] CLAPES P, FESSNER W D, SPRENGER G A, et al. Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases [J]. **Current Opinion in Chemical Biology**, 2010, 14(2):154-167.
- [8] MACHAJEWSKI T D, WONG C H. The catalytic asymmetric aldol reaction [J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2000, 39(8):1352-1375.
- [9] SUGIYAMA M, HONG Z, GREENBERG W A, et al. In vivo selection for the directed evolution of L-rhamnulose aldolase from L-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD)[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2007, 15(17):5905-5911.
- [10] BREUER M, HAUER B. Carbon-carbon coupling in biotransformation [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2003, 14(6):570-576.
- [11] FESSNER W D, SINERIUS G. Synthesis of dihydroxyacetone phosphate (and isosteric analogues) by enzymatic oxidation; sugars from glycerol[J]. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 1994, 33(2):209-212.
- [12] ISRAEL S M, JUAN F G G, BASTISA A, et al. Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C-C bond formation from dihydroxyacetone[J]. **Chemical Communications**, 2004, 35(14):1634-1635.
- [13] CRANS D C, WHITESIDES G M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, sn-glycerol-3-phosphate, and chiral analogs[J]. **Journal of the American Chemical Society**, 1985, 107(24):7019-7027.
- [14] FEESE M D, FABER H R, BYSTROM C E, et al. Glycerol kinase from *Escherichia coli* and an Ala65→Thr mutant: The crystal structures reveal conformational changes with implications for allosteric regulation[J]. **Structure**, 1998, 6(11):1407-1418.
- [15] BANG Zuning, ZHOU Jinyao, WAN Min, et al. Studies on purification and properties of glycerokinase from *Bacillus Stearothermophilus*[J]. **Pharmaceutical Industry**, 1988, 19(1):1-4. (in Chinese)
- [16] ZHOU Jinyao, BANG Zuning, ZHAO Yuxiu, et al. Improvement research on purification of glycerokinase[J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**, 1992, 1(1):1-4. (in Chinese)
- [17] LI Z, CAI L, QI Q, et al. Synthesis of rare sugars with l-fuculose-1-phosphate aldolase (FucA) from *thermus thermophilus* HB8[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2011, 21(17):5084-5087.
- [18] LI Z, CAI L, WEI M, et al. One-pot four-enzyme synthesis of ketoses with fructose 1,6-bisphosphate aldolases from *Staphylococcus carnosus* and rabbit muscle[J]. **Carbohydrate Research**, 2012, 357:143-146.
- [19] LI Z, CAI L, QI Q, et al. Enzymatic synthesis of D-sorbose and D-psicose with aldolase RhaD: Effect of acceptor configuration on enzyme stereoselectivity[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2011, 21(23):7081-7084.
- [20] LI Z, QIAO Y, CAI L, et al. Characterization of glycerol phosphate oxidase from *Streptococcus pneumoniae* and its application for ketose synthesis[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2015, 25(3):504-507.
- [21] LI Z, WU X, CAI L, et al. Enzymatic synthesis of rare sugars with l-rhamnulose-1-phosphate aldolase from *Thermotoga maritima* MSB8[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2015, 25(18):3980-3983.
- [22] KIHARA F, ITOH K, IWASAKA M, et al. Glycerol kinase activity and glycerol kinase-3 gene are up-regulated by acclimation to 5 °C in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 2009, 39(11):763-769.