

# 过表达果糖脱氢酶促进氧化葡萄糖酸杆菌 高效合成 5-酮果糖

钱雪<sup>1</sup>, 赵晨休<sup>1</sup>, 林金萍<sup>\*1,2,3</sup>, 魏东芝<sup>1,2,3</sup>

(1. 华东理工大学 生物工程学院, 上海 200237; 2. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 3. 华东理工大学 中国轻工业生物催化与智能制造重点实验室, 上海 200237)

**摘要:** 5-酮果糖(5-KetoFructose, 5-KF)具有与 D-果糖相似的甜度和自然甜味,且不能被人体代谢而具有低热量的优点,是一种具有发展前景的非营养型天然甜味剂。为了获得 5-酮果糖高产菌株,作者将来源于 *Gluconobacter japonicus* 的膜结合的果糖脱氢酶基因在 *Gluconobacter oxydans* 中过表达,通过对不同的宿主、表达载体和启动子的筛选,获得一株能够高效合成 5-KF 的工程菌 QT-10。在 3 L 发酵罐中进行补料发酵优化,最终采用恒速连续流加果糖的方式,该工程菌可在 82 h 内消耗质量浓度为 650 g/L 的 D-果糖,5-KF 的产量高达 608 g/L,产率为 94.6%,时空产率为 7.41 g/(L·h)。

**关键词:** 5-酮果糖;果糖脱氢酶;氧化葡萄糖酸杆菌;重组表达;发酵优化

中图分类号:Q 815 文章编号:1673-1689(2024)06-0058-09 DOI:10.12441/spyswjs.20230106002

## Efficient Production of 5-KetoFructose by *Gluconobacter oxydans* via Overexpression of Fructose Dehydrogenase

QIAN Xue<sup>1</sup>, ZHAO Chenxiu<sup>1</sup>, LIN Jinping<sup>\*1,2,3</sup>, WEI Dongzhi<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. Key Laboratory of Biocatalysis and Intelligent Manufacturing, China National Light Industry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** 5-Ketofructose (5-KF) has a similar sweet taste quality as D-fructose, and cannot be metabolized by humans, giving it a low caloric value. These properties illustrate 5-KF can become a potential candidate for a non-nutritive natural sweetener. In this study, the 5-KF producing strain was constructed via overexpression of membrane-bound fructose dehydrogenase gene from *Gluconobacter japonicus* in *Gluconobacter oxydans*. By screening different expression hosts, expression vectors and promoters, the engineered strain QT-10 which can efficiently synthesis 5-KF was obtained. The fed fermentation process was optimized in a 3 L fermenter. Finally, 650 g/L D-fructose could be

收稿日期: 2023-01-06 修回日期: 2023-04-03

基金项目: 国家“十三五”重点研发计划项目(2021YFC2100300)。

\* 通信作者: 林金萍(1976—),女,博士,副研究员,博士研究生导师,主要从事生物催化与酶工程、合成生物学研究。

E-mail: jplin@ecust.edu.cn

completely transformed in 82 h with continuous fructose-feeding strategy, and up to 608 g/L 5-KF was reached with the yield of 94.6% and the space-time yield of 7.41 g/(L·h).

**Keywords:** 5-KetoFructose, fructose dehydrogenase, *Gluconobacter oxydans*, recombinant expression, fermentation optimization

5-酮果糖作为果糖的衍生物之一,存在于如蜂蜜、白葡萄酒和接骨木糖浆等食品与药品中<sup>[1-2]</sup>。5-KF具有与D-果糖相似的自然甜味和内在甜味阈值<sup>[3-4]</sup>。研究表明,5-KF几乎不能被人体吸收和代谢,热量非常低<sup>[5]</sup>。因此,5-KF被认为是一种新型有发展前景的非营养型天然甜味剂。除了用作甜味剂,5-KF还可以用作合成吡咯烷亚氨基糖(糖苷酶抑制剂)的原料<sup>[6]</sup>。

目前,5-KF的合成方法主要有化学法、酶催化法和发酵法。化学法是以Pt/C为催化剂,直接氧化D-果糖制备5-KF,其产率低,反应条件比较苛刻。酶催化法生产5-KF主要是利用纯化的吡喃糖-2-氧化酶和过氧化氢酶催化L-山梨糖生产5-KF,产量可达153 g/L<sup>[7]</sup>,但酶生产成本高、酶活力不稳定等问题限制了该方法的工业化应用。发酵法是通过细菌发酵直接将D-果糖转化成5-KF,具有成本低、反应条件温和、易于建立发酵控制策略和放大培养等优点<sup>[8]</sup>,已成为5-KF生产的首选方法。

1960年Terada等首次报道了醋酸菌可氧化D-果糖生成5-KF<sup>[9]</sup>。目前,已报道的能够生产5-KF的微生物多为*Gluconobacter* sp.<sup>[10]</sup>,其主要是通过膜结合的果糖脱氢酶选择性氧化D-果糖合成5-KF<sup>[11]</sup>。研究发现,来自*G.thailandicus* NBRC 3258的甘油脱氢酶也能够氧化果糖合成5-酮果糖<sup>[12]</sup>。Herweg等在*G.oxydans* 621H中利用质粒外源表达来自*G.japonicus* NBRC3260或者*G.japonicus* LMG1281的果糖脱氢酶,构建了一株高产5-KF的菌株,并通过分批补料发酵使产物5-KF的质量浓度达到了489 g/L<sup>[3]</sup>。除了以D-果糖为底物发酵生产5-KF,研究者还尝试利用蔗糖<sup>[13]</sup>、甘露醇<sup>[14]</sup>等其他原料生产5-KF,但是底物投量和转化效率都明显低于以果糖为底物的5-KF发酵生产过程。

氧化葡萄糖酸杆菌(*G.oxydans*)是一种GRAS(generally recognized as safe)菌株,同时也是工业生产米格列醇<sup>[15]</sup>、二羟基丙酮<sup>[16]</sup>、维生素C<sup>[17-18]</sup>等化学品及其中间体的重要菌种。作者所在团队前期研究

发现,*G.oxydans*能以D-果糖为碳源进行生长,但是不能转化D-果糖生成5-酮果糖。作者以*G.oxydans* DSM2003为宿主,异源表达源于*Gluconobacter japonicus* CGMCC1.15609的膜结合的果糖脱氢酶,以实现5-KF的生产。通过宿主、表达载体和启动子等表达元件的优化,筛选高产5-KF的工程菌,并在发酵罐中进行补料培养来提高5-KF的产量,为5-KF的高效生产提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株及质粒** 大肠杆菌*E.coli* DH5 $\alpha$ 和*G.oxydans* DSM2003分别用于表达载体的构建和生产菌株,其中所使用的主要菌株和质粒分别见表1和表2。

**1.1.2 主要试剂与仪器** 限制性内切酶、T4 DNA Ligase:美国赛默飞世尔科技公司;Fast-pfu DNA polymerase、DNA marker:北京全式金生物公司;Prime Star高保真酶、Ex Taq DNA聚合酶:TaKaRa有限公司;质粒提取试剂盒:AXYGEN公司;胶回收试剂盒、DNA纯化试剂盒:OMEGA公司;D-山梨醇:上海罗盖特公司;D-果糖:上海阿拉丁公司;酵母粉:安琪酵母股份有限公司;L-谷氨酰胺:上海生物工程股份有限公司;磷酸二氢钾、硫酸镁:国药集团上海化学试剂公司;头孢西丁钠:上海新亚药业有限公司;硫酸庆大霉素:美国Sigma公司。

PCR扩增仪:杭州博日科技有限公司;电泳图像分析仪IT055-0400:上海伊科赛生物有限公司;生化培养箱:上海博讯实业有限公司;3 L发酵系统:上海百伦生物科技有限公司;反向色谱柱87H3:美国Transgenomic INC;高效液相色谱仪:美国安捷伦公司。

### 1.1.3 培养基

1)种子培养基(组分g/L):D-山梨醇80,酵母粉20,磷酸二氢钾1,硫酸镁0.3,谷氨酰胺0.1;pH 5.5~6.0。

表 1 本研究中的菌种

Table 1 Strains used in this study

菌株	描述	来源
<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$	用于质粒扩增	天根生化有限公司
<i>E.coli</i> HB101/PRK2013	三亲本转化辅助菌	作者所在实验室
<i>Gluconobacter japonicus</i> CGMCC1.15609	野生型	中国普通微生物菌种保藏管理中心
<i>G. oxydans</i> DSM2003	Cef <sup>R</sup> , 野生型	作者所在实验室
<i>G. oxydans</i> #1	<i>G. oxydans</i> DSM2003 进化菌株	作者所在实验室
<i>G. oxydans</i> ATCC621H	Cef <sup>R</sup> , 野生型	作者所在实验室
<i>G. oxydans</i> DSM2003 pBBR1MCS-5	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入空载质粒 pBBR1MCS, Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-1	<i>G. oxydans</i> #1 中转入重组质粒 pBBR1MCS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-2	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR1MCS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-3	<i>G. oxydans</i> ATCC621H 中转入重组质粒 pBBR1MCS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-4	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-10- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-5	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-35- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-6	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-3510- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-7	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-RBS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-8	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-R35- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-9	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-R31- <i>tufB</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究
QT-10	<i>G. oxydans</i> DSM2003 中转入重组质粒 pBBR-3510- <i>gHp0169</i> - <i>fdh</i> , Cef <sup>R</sup> ; Gm <sup>R</sup>	本研究

表 2 本研究中的重组质粒

Table 2 Plasmids used in this study

质粒	描述	来源
pBBR1MCS-5	Gm <sup>R</sup> ; 广宿主质粒	作者所在实验室
pBBR-10	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR-35	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR-3510	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR-RBS	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR-R35	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR-R31	Gm <sup>R</sup> ; pBBR1MCS-5 衍生质粒	作者所在实验室
pBBR1MCS- <i>tufB</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子	本研究
pBBR-3510- <i>gHp0169</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>gHp0169</i> 启动子	本研究
pBBR1MCS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-10- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-35- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-3510- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-RBS- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-R35- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-R31- <i>tufB</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>tufB</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究
pBBR-3510- <i>gHp0169</i> - <i>fdh</i>	Gm <sup>R</sup> ; 含 <i>gHp0169</i> 启动子和 <i>fdh</i> 基因	本研究

2)发酵培养基(组分 g/L):一定质量浓度的 D-果糖,酵母粉 20,磷酸二氢钾 1,硫酸镁 0.3,谷氨酰胺 0.1;pH 6.0。

1.2 试验方法

1.2.1 重组质粒的构建 为了在 *G.oxydans* 中异源表达果糖脱氢酶(FDH),使用引物对 FRUC *Bam*H I-F/FRUC-*Eco*R I-R 从 *G.japonicus* CGMCC1.15609 基因组中扩增编码目的基因 *fdh*(3 714 bp),使用引物对 TufB-*Sac* I-F/TufB-*Xba* I-R 从 *G.oxydans* DSM2003 基因组中扩增编码启动子的 *tufB* 基因。质粒 pBBR1MCS-5 和启动子 *tufB* 的片段经核酸内切酶 *Xba* I 和 *Sac* I 线性化,跑胶回收后通过 T4 DNA 连接酶连接以构建质粒 pBBR1MCS-*tufB*。质粒 pBBR1MCS-*tufB* 和 *fdh* 片段经核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 线性化并跑胶回收后,利用 T4 DNA 连接酶连接,构建得到重组质粒 pBBR1MCS-*tufB*-*fdh*。重组质粒 pBBR-10-*tufB*-*fdh*、pBBR-35-*tufB*-*fdh*、pBBR-3510-*tufB*-*fdh*、pBBR-RBS-*tufB*-*fdh*、pBBR-R35-*tufB*-*fdh*、pBBR-R31-*tufB*-*fdh* 和 pBBR-3510-*gHp0169*-*fdh* (使用引物对 *gHp0169*-*Sac* I-F/*gHp0169*-*Xba* I-R 从 *G.oxydans* DSM2003 基因组中扩增编码启动子 *gHp0169* 的基因)也采用 T4 DNA 连接酶连接的方法依次构建,见表 3。

表 3 本研究中的引物

Table 3 Primers used in this study

引物	引物序列(5'→3')
FRUC- <i>Bam</i> H I-F	CGGGATCCTCAGGAGAAGGCCAATG GAAAA
FRUC- <i>Eco</i> R I-R	GGAATTCAAAGACTTACCCCTGTTC AGG
TufB- <i>Sac</i> I-F	ACTGAGCTCCCGTTACGGTGCTCTC GAA
TufB- <i>Xba</i> I-R	ATATCTAGACCAAAACCCCGCTC
<i>gHp0169</i> - <i>Sac</i> I-F	ATAGAGCTCTGAAAGCGGCTGCGC GT
<i>gHp0169</i> - <i>Xba</i> I-R	GCATCTAGAGCGGAAGCCGTTATAC CCTGA

1.2.2 重组菌的构建与表达

1)大肠杆菌重组菌株的构建 将上述重组质粒转至 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态中,随机挑取转化子进行菌落 PCR 验证,条带大小完全正确的即为阳性转化子,将阳性转化子进行扩增培养并送上海桑尼生物科技有限公司进行 Sanger 测序,测序正确则重组

大肠杆菌构建成功。

2)氧化葡萄糖杆菌重组菌株的构建 获得带有正确重组质粒的 *E.coli* DH5 $\alpha$  菌株后,通过三亲本结合转化法<sup>[19]</sup>将重组质粒转入氧化葡萄糖杆菌细胞中,随机挑取转化子进行菌落 PCR 验证,条带大小完全正确的即为阳性转化子,将阳性转化子进行扩增培养并送上海桑尼生物科技有限公司进行 Sanger 测序,测序正确则重组氧化葡萄糖杆菌构建成功。按此方法与流程,作者依次构建 QT-1、QT-2、QT-3、QT-4、QT-5、QT-6、QT-7、QT-8、QT-9 和 QT-10 等工程菌株。

1.2.3 培养条件

1)种子活化 从-40℃冰箱取出甘油管解冻,用接种环蘸取菌液在固体培养基上划线,30℃静置培养 24 h;随后挑取单菌落接入液体种子培养基中,置于 30℃、200 r/min 的恒温摇床中培养菌体至对数期(18~20 h)。

2)摇瓶培养 将活化的种子液按体积分数 1% 转接至液体发酵培养基中(装液体积分数 20%),在 30℃、200 r/min 的恒温摇床中培养 16~18 h。

3)发酵罐培养 将种子液按体积分数 10% 的转接至含发酵培养基的 3 L 发酵罐中,在线自动调控使发酵罐中 pH 维持在 6.0,初始通气量和初始搅拌转速分别为 8 L/min 和 200 r/min,发酵过程中通过控制搅拌和通气使溶氧控制在 20% 以上。

1.2.4 初始 D-果糖质量浓度对发酵的影响 在 1 L 锥形瓶中加入 200 mL D-果糖发酵培养基(一定质量浓度的 D-果糖、酵母粉 20 g/L、磷酸二氢钾 1 g/L、硫酸镁 0.3 g/L、谷氨酰胺 0.1 g/L,pH 6.0),置于 30℃恒温摇床中于 200 r/min 培养,pH 控制在 6.0。定时取样测生物量,并用 HPLC 检测 D-果糖和 5-KF 质量浓度。

1.2.5 静息细胞催化试验 将氧化葡萄糖杆菌菌株培养至指数后期,8 000 r/min 离心 20 min,收集菌体,然后用生理盐水洗涤 2 次以获得静息细胞。在 30℃、200 r/min 的摇瓶中,10 mL 反应体系组成为:底物 D-果糖 150 mmol/L,静息细胞质量浓度 20 g/L,控制催化体系 pH 6.0,间隔取样。

1.2.6 检测方法

1)生物量的测定 将样品稀释至一定倍数、用紫外分光光度计在波长 600 nm 处测 OD 值。

2)D-果糖和 5-KF 质量浓度的测定 发酵液



样品经 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液,用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,利用 HPLC 检测 *D*-果糖和 5-KF。色谱柱为 ICE-COREGEL87H3,检测器为示差折光检测器,流动相为 5 mmol/L 的  $\text{H}_2\text{SO}_4$  溶液,流量为 0.38 mL/min,柱温为 55  $^\circ\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

催化效率( $S_p$ )、产率( $Y$ )和时空产率( $V_p$ )的计算分别见式(1)~(3)。

$$S_p = \frac{\rho_1 - \rho_0}{\rho t} \quad (1)$$

式中: $S_p$  为催化效率,  $\text{h}^{-1}$ ;  $\rho_1$  为反应终产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $\rho_0$  为反应初始产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $\rho$  为反应中静息细胞质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $t$  为反应时间,  $\text{h}$ 。

$$Y = \frac{\rho_1 - \rho_0}{\rho_d F} \times 100\% \quad (2)$$

式中: $Y$  为产率, %;  $\rho_1$  为反应终产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $\rho_0$  为反应初始产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $\rho_d$  为初始底物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $F$  为底物转化为等量产物的化学计量平衡因子,为 0.989。

$$V_p = \frac{\rho_1 - \rho_0}{t} \quad (3)$$

式中: $V_p$  为时空产率,  $\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ;  $\rho_1$  为反应的终产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $\rho_0$  为反应初始产物质量浓度,  $\text{g/L}$ ;  $t$  为反应时间,  $\text{h}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 果糖脱氢酶在 *G. oxydans* 中的高效表达

膜结合的果糖脱氢酶在 *G. oxydans* 的异源高效表达是实现其高产 5-KF 的前提。合适的表达元件(如表达宿主、启动子、表达载体等)对酶基因高效表达至关重要。作者所在课题组前期研究发现,菌株 *G. oxydans* 621H 和 *G. oxydans* DSM2003 在生长、代谢以及接受外源基因的能力等方面存在明显差异。

作者首先考察了不同的 *G. oxydans* 宿主对 *fdh* 表达的影响,包括 *G. oxydans* 621H、*G. oxydans* DSM2003 以及 *G. oxydans* #1 (本课题组前期获得的 *G. oxydans* DSM2003 适应性进化菌,能耐受较高浓度的多元醇<sup>[20-21]</sup>)。将 *fdh* 来源菌 *G. japonicus* CGMCC1.15609 菌株以及带有 pBBR1MCS-5 空载质粒的 *G. oxydans* 作为对照。将获得的工程菌和对照菌在摇瓶中进行静息细胞催化 *D*-果糖反应,比较 5-KF 的生产能力,结果见图 1(a)。*fdh* 来源菌株 *G. japonicus* CGMCC1.15609 能够催化果糖生成 5-KF,但是催化效率很低,为  $(0.02 \pm 0.02) \text{h}^{-1}$ 。仅转入

载体的对照菌 *G. oxydans* DSM2003/pBBR1MCS 不能催化果糖生成 5-KF,而所有外源表达了 *fdh* 的工程菌株均表现出较高的催化效率,显著高于对照菌株。其中,QT-1 和 QT-2 的催化效率相当,分别为  $(0.28 \pm 0.06) \text{h}^{-1}$  和  $(0.28 \pm 0.05) \text{h}^{-1}$ ,高于 QT-3 的  $(0.24 \pm 0.03) \text{h}^{-1}$ 。考虑到培养时 *G. oxydans* DSM2003 的生物量高于 *G. oxydans* #1,因此选择 *G. oxydans* DSM2003 作为表达宿主。

表达质粒对基因的表达效率有着重要影响。pBBR1MCS-5 是一种常用在 *G. oxydans* 中的表达载体,但其拷贝数较低。在之前的研究中,作者所在课题组通过理性改造得到了 6 种拷贝数提高的 pBBR1MCS-5 衍生质粒<sup>[22]</sup>(分别命名为 pBBR-10、pBBR-35、pBBR-3510、pBBR-RBS、pBBR-R35、pBBR-R31)。为了获得 5-KF 高产菌,将这 6 种突变质粒分别用于 *G. oxydans* DSM2003 中表达 *fdh* 基因,得到了 6 种重组工程菌,分别为 QT-4、QT-5、QT-6、QT-7、QT-8 和 QT-9。以 pBBR1MCS-5 构建的工程菌 QT-2 作为对照,在摇瓶中进行静息细胞催化反应,对得到的 7 种 FDH 过表达的 *G. oxydans* 工程菌合成 5-KF 的能力进行考察,结果见图 1(b)。在相同的反应时间内,所有的工程菌都可以将 150 mmol/L 的 *D*-果糖转化完全,而利用突变质粒构建的重组菌的 *D*-果糖转化速率均比对照菌 QT-2 有不同程度提高,其中工程菌 QT-6 的催化效率为  $(0.45 \pm 0.02) \text{h}^{-1}$ ,比对照菌提高了约 57%。因此选择 pBBR-3510 作为 *fdh* 的最适表达载体。

启动子 *tufB* 和 *gHp0169* 被证实是可以在 *G. oxydans* 中高效表达多种同源和异源基因的强启动子<sup>[23]</sup>。在确定最佳表达载体 pBBR-3510 的基础上,利用 *gHp0169* 启动子构建了表达 *fdh* 的工程菌 QT-10。其静息细胞转化果糖生产 5-KF 的催化效率高于工程菌 QT-6,见图 1(c)。

综上,通过表达宿主、表达载体和启动子的筛选,成功构建了用于 5-KF 生产的工程菌,选取催化效率最高的 QT-10,对其发酵生产 5-KF 的能力进行研究。

### 2.2 *D*-果糖质量浓度对 QT-10 生长和催化活性的影响

在以氧化葡萄糖酸杆菌为生产菌发酵转化生产 5-KF 时,*D*-果糖既是菌体生长的唯一碳源也是转化生产 5-KF 的底物,工业化大规模生产 5-KF

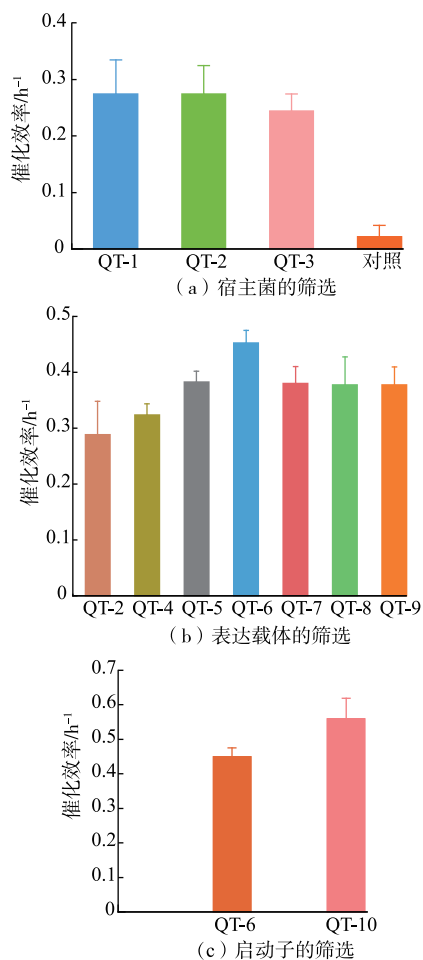


图1 *G.oxydans* 工程菌株的5-KF生产效率比较

Fig. 1 Comparison of 5-KF productivity by different engineered *G.oxydans* strains

需要投入高质量浓度的D-果糖,但底物质量浓度过高,可能会导致反应发生碳代谢抑制、渗透胁迫和底物抑制<sup>[24-26]</sup>,高渗透压会使菌体生长的延滞期变长,进而影响生物量和转化速率<sup>[27-28]</sup>。为了确定发酵培养基中最佳的D-果糖添加质量浓度,首先在摇瓶中考察了发酵培养基中初始D-果糖质量浓度(40、60、80、100、120、150 g/L)对QT-10的生长及发酵产5-KF的影响,结果见表4。

当培养基中初始D-果糖质量浓度在40~100 g/L时,菌体生物量随着D-果糖质量浓度的提高而提高。发酵60 h后,所有不同质量浓度的D-果糖都转化为5-KF,产率接近100%。当初始D-果糖质量浓度提高至120 g/L时,生物量继续提高,但是5-KF的产量仅有微量提升,产率比添加100 g/L的D-果糖时明显下降。进一步提高D-果糖添加量至150 g/L时,菌体生物量不再变化,尽管5-KF的产量有所提

高,但是5-KF产率进一步下降,仅为69.6%,且发酵液中剩余D-果糖量提高。这些结果说明,提高培养基中的D-果糖质量浓度可促进菌体的生长,但当培养基中一次性投入较高质量浓度(100 g/L以上)的D-果糖会对菌体发酵产5-KF的活力产生不利影响,这可能是高质量浓度果糖对FDH的活性产生了抑制。为此,我们通过静息细胞催化实验考察FDH对D-果糖的耐受质量浓度,结果见图2。

表4 D-果糖质量浓度对工程菌QT-10生长及发酵的影响  
Table 4 Effect of concentration of D-fructose on the growth and fermentation of engineered strain QT-10

底物质量浓度/(g/L)	最大OD <sub>600</sub>	残余D-果糖质量浓度/(g/L)	5-KF质量浓度/(g/L)	产率/%
40	1.2±0.2	0	36.9±0.9	93.3
60	2.0±0.4	0	56.2±3.6	94.7
80	2.4±0.1	0	75.8±4.6	95.7
100	2.8±0.3	0.8±0.2	94.4±3.0	95.4
120	3.1±0.3	18.2±2.0	96.6±2.5	81.4
150	3.1±0.2	42.5±2.7	103.2±3.6	69.6

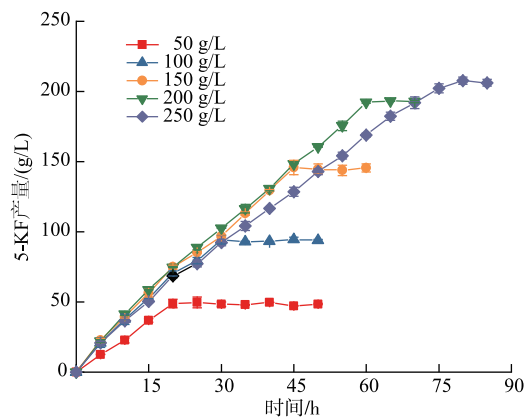


图2 D-果糖质量浓度对工程菌QT-10催化活性的影响  
Fig. 2 Effect of concentration of D-fructose on the catalytic activity of engineered strain QT-10

当D-果糖质量浓度为50~200 g/L时,20 g/L的静息细胞都可以实现底物的完全转化,但是完成反应所需的时间从20 h延长至58 h。随着底物质量浓度从50 g/L提高到150 g/L,5-KF的生成速率有不同程度提高,但提高幅度逐渐减小。继续提高D-果糖质量浓度至200 g/L,产物的生成速率基本不变。当进一步提高D-果糖质量浓度至250 g/L时,对果糖脱氢酶的抑制作用更为明显,表现为反应速

率下降,即使转化时间延长至 85 h,*D*-果糖仍无法完全转化,底物的转化率仅为 83.4%。

根据以上结果,考虑采取补加 *D*-果糖的发酵方式生产 5-KF,即在发酵过程中的初始阶段控制较低的 *D*-果糖质量浓度,以保证菌体的生长,当生长基本停止时补加 *D*-果糖,继续转化合成高质量浓度的 5-KF。

### 2.3 不同补料策略对工程菌发酵产 5-KF 的影响

**2.3.1 分批补料对工程菌发酵的影响** 根据 *D*-果糖质量浓度对 QT-10 生长和催化活性的影响试验,将发酵培养基中的初始 *D*-果糖质量浓度设定为 100 g/L,当发酵液中的 *D*-果糖将要耗尽时,分两次补加 *D*-果糖(维持发酵液中 *D*-果糖质量浓度不超过 200 g/L),实际 *D*-果糖补料质量浓度分别为 175 g/L(约 28 h 时)和 150 g/L(约 42 h 时),工程菌的发酵过程曲线见图 3(a)。

在发酵初期菌体生长快速,28 h 时  $OD_{600}$  达到 8.22,此时发酵液中 *D*-果糖的质量浓度降至 15 g/L 以下,补加 175 g/L 的 *D*-果糖后菌体持续快速生长,在 42 h 时生物量达到最高, $OD_{600}$  为 11.64,此时发酵液中的 *D*-果糖质量浓度降至 37 g/L。此后,再次向体系中补加 150 g/L 果糖,菌体生长进入稳定期,生物量不再增加且菌体生物量有下降的趋势。从 *D*-果糖的消耗和 5-KF 的生成曲线来看,发酵的第一阶段,*D*-果糖的消耗与菌体生长基本同步,100 g/L 的 *D*-果糖在发酵 28 h 后基本耗尽,5-KF 产量为 80.8 g/L,时空产率仅为 2.9 g/(L·h)。此后,当菌体生长至一定质量浓度时,发酵第二、三阶段主要表现为细胞转化 *D*-果糖生产 5-KF,由于发酵罐中积累了较高质量浓度的菌体,*D*-果糖转化生成 5-KF 的速率明显提高,时空产率分别为 10.6 g/(L·h) 和 7.7 g/(L·h)。相比第二阶段,第三阶段的果糖转化效率有所降低,主要原因是补料导致的单位体积菌体质量浓度的减少。总之,在(100+175+150) g/L 分批补料发酵实验中,工程菌 QT-10 可在 65 h 完全消耗 425 g/L 的 *D*-果糖, $OD_{600}$  达到 11.64,5-KF 产量为 404.3 g/L,时空产率为 6.2 g/(L·h),产率为 96.2%。

从(100+175+150) g/L 分批补料发酵实验可以看出,第二次补加果糖后,工程菌仍维持较高的果糖转化能力,尝试在此基础上增加一次果糖补料,以探究 QT-10 的 5-KF 生产潜力。发酵培养基中的

初始 *D*-果糖质量浓度为 100 g/L,3 次补加的 *D*-果糖质量浓度分别为 180、150、160 g/L。发酵过程见图 3(b)。在(100+180+150+160) g/L 分批补料发酵实验中,前三阶段的细胞生长、*D*-果糖消耗和 5-KF 生成情况与(100+175+150) g/L 分批补料发酵过程类似,发酵进行到 42 h 时生物量达到最高, $OD_{600}$  为 11.52,前三阶段的时空产率分别为 2.9、10.5、8.4 g/(L·h)。第 3 次补加 160 g/L 的 *D*-果糖后,发酵持续至 105 h 时,发酵液中已检测不到 *D*-果糖,同时可以看出细胞转化活性显著降低,第四阶段的时空产率降至 4.0 g/(L·h)。通过(100+180+150+160) g/L 分批补料发酵,QT-10 可完全转化高达 612 g/L 的 *D*-果糖,5-KF 的产量为 573 g/L,产率为 94.6%,时空产率为 5.5 g/(L·h)。

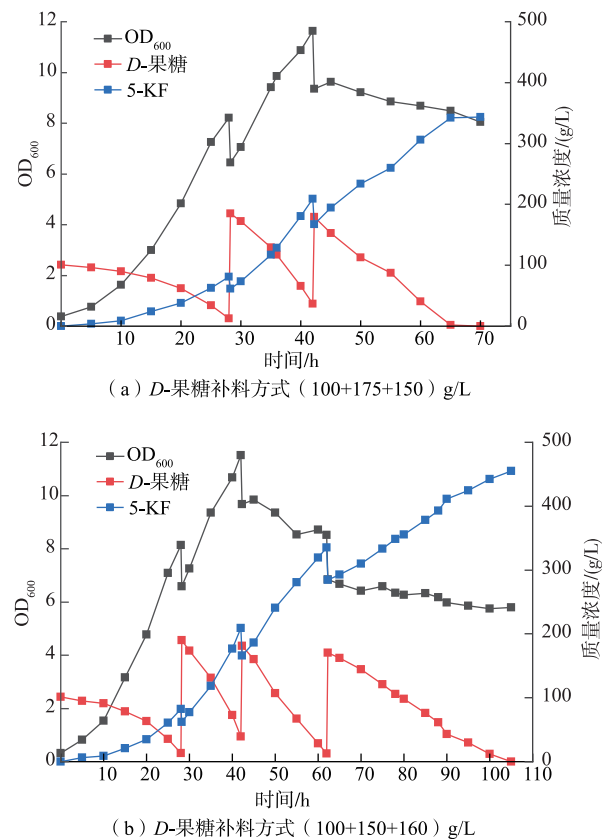


图 3 分批补料发酵 *D*-果糖生产 5-KF 的过程曲线  
Fig. 3 Profile of fed-batch fermentation of *D*-fructose to 5-KF

**2.3.2 恒速连续补料对工程菌发酵的影响** 为了探索不同补料方式对 QT-10 生产 5-KF 的影响,作者对恒速连续补加 *D*-果糖的发酵过程进行了研究,见图 4。



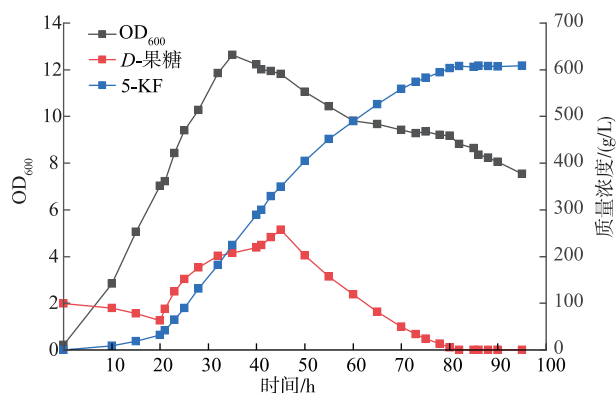


图4 连续补料发酵D-果糖生产5-KF的过程曲线

Fig. 4 Profile of continuous feeding fermentation of D-fructose to 5-KF

发酵体系的初始底物D-果糖质量浓度为100 g/L,压缩空气进气量恒定在8 L/min。当工程菌生长至对数生长期(大约20 h)时开始流加底物,根据上述(100+180+150+160) g/L分批补料发酵实验中第二阶段底物消耗的时空产率为10.7 g/(L·h),流加D-果糖的速率要大于此消耗速率,因此将流量设定为22 g/(L·h)。连续流加25 h,发酵液中加入的D-果糖总量为650 g/L,菌体生长到35 h时,生物量达到最高,OD<sub>600</sub>为12.64。相比前面的分批补料发酵,恒速补料发酵可在较短的时间内使发酵液中菌体量达到较高的质量浓度,有利于后续的D-果糖转

化。通过控制D-果糖的流加速度以维持恒定的5-KF生成速率,当发酵进行到82 h时,发酵液中的D-果糖被完全消耗,5-KF最终产量达到608 g/L,产率为94.6%,时空产率为7.41 g/(L·h),相比分批补料的发酵策略,恒速连续补加底物的发酵速率更快,有更高的时空产率。

### 3 结语

5-KF作为一种有潜力的新型非营养型天然甜味剂,具有良好的发展前景。目前报道的5-KF合成方法的生产效率无法达到工业化生产的要求。作者将来自*G.japonicus* CGMCC1.15609的果糖脱氢酶在*G.oxydans*中异源表达,通过优化表达宿主、表达载体以及启动子,获得了一株高效转化D-果糖生产5-KF的工程菌QT-10。较高的D-果糖质量浓度会对细胞生长和5-KF转化活性产生影响,为此在发酵罐中对D-果糖的补料发酵条件进行了研究,结果表明连续流加D-果糖相比分批补加可获得更高的生物量和生产效率。采用连续补加D-果糖的策略,工程菌可在82 h内完全转化650 g/L的D-果糖,生成高达608 g/L的5-KF,产率达到94.6%,时空产率为7.41 g/(L·h)。本研究得到的5-KF产量为当前文献报道的最高水平,为5-KF的高效生物合成提供了潜力菌种。

### 参考文献:

- [1] BURROUGHS L F, SPARKS A H. Sulphite-binding power of wines and ciders. 3. Determination of carbonyl compounds in a wine and calculation of its sulphite-binding power[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1973, 24(2):207-217.
- [2] BLASI M, BARBE J C, DUBOURDIEU D, et al. New method for reducing the binding power of sweet white wines[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(18):8470-8474.
- [3] HERWEG E, SCHÖPPING M, ROHR K, et al. Production of the potential sweetener 5-ketofructose from fructose in fed-batch cultivation with *Gluconobacter oxydans*[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 259:164-172.
- [4] SIEMEN A, KOSCIOW K, SCHWEIGER P, et al. Production of 5-ketofructose from fructose or sucrose using genetically modified *Gluconobacter oxydans* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(4):1699-1710.
- [5] SCHIESSL J, KOSCIOW K, GARSCHAGEN L S, et al. Degradation of the low-calorie sugar substitute 5-ketofructose by different bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(6):2441-2453.
- [6] ASANO N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66(9):1479-1492.
- [7] SCHNEIDER K, DORSCHIED S, WITTE K, et al. Controlled feeding of hydrogen peroxide as oxygen source improves production of 5-ketofructose from L-sorbose using engineered pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(11):2941-2945.
- [8] 张静, 刘孟粟, 秦志杰, 等. 吡咯喹啉醌高产菌株选育及发酵优化[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(16):56-64.  
ZHANG J, LIU M S, QIN Z J, et al. Breeding and fermentation optimization of high titer pyrroloquinoline quinone strain[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(16):56-64. (in Chinese)
- [9] TERADA O, SUZUKI S, KINOSHITA S. Oxidation of fructose by members of *Acetobacter*. part VII [J]. *Journal of the*



- Agricultural Chemical Society of Japan**, 1962, 36(3):217-221.
- [10] NGUYEN T M, GOTO M, NODA S, et al. The 5-ketofructose reductase of *Gluconobacter* sp. strain CHM43 is a novel class in the shikimate dehydrogenase family[J]. **Journal of Bacteriology**, 2021, 203(19):e0055820.
- [11] KAWAI S, GODA-TSUTSUMI M, YAKUSHI T, et al. Heterologous overexpression and characterization of a flavoprotein-cytochrome c complex fructose dehydrogenase of *Gluconobacter japonicus* NBRC3260 [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2013, 79(5):1654-1660.
- [12] ANO Y, HOURS R A, AKAKABE Y, et al. Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of *D*-pentonates to 4-keto-*D*-pentonates, *D*-fructose to 5-keto-*D*-fructose, and *D*-psicose to 5-keto-*D*-psicose [J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2017, 81(2):411-418.
- [13] HOFFMANN J J, HÖVELS M, KOSCIOW K, et al. Synthesis of the alternative sweetener 5-ketofructose from sucrose by fructose dehydrogenase and invertase producing *Gluconobacter* strains[J]. **Journal of Biotechnology**, 2020, 307:164-174.
- [14] ADACHI O, NGUYEN T M, HOURS R A, et al. 5-Keto-*D*-fructose production from sugar alcohol by isolated wild strain *Gluconobacter frateurii* CHM 43[J]. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 2020, 84(8):1745-1747.
- [15] KE X, YU P H, HU Z C, et al. Synergistic improvement of PQQ-dependent *D*-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* for the biosynthesis of miglitol precursor 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- $\alpha$ -*L*-sorbofuranose[J]. **Journal of Biotechnology**, 2019, 300:55-62.
- [16] LI M H, WU J, LIU X, et al. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*[J]. **Bioresource Technology**, 2010, 101(21):8294-8299.
- [17] 蔡文, 曾伟主, 周景文. 氧化葡萄糖酸杆菌产 2-酮基-D-葡萄糖酸的发酵过程优化[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(11):40-45.  
CAI W, ZENG W Z, ZHOU J W. Optimized fermentation process of *Gluconobacter oxydans* producing 2-keto-*D*-gluconic acid[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2019, 45(11):40-45. (in Chinese)
- [18] 陈吉铭, 堵国成, 陈坚, 等. 普通生酮基古龙酸菌 2-酮基-L-古龙酸合成途径在氧化葡萄糖酸杆菌中的整合表达与强化[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(6):611-616.  
CHEN J M, DU G C, CHEN J, et al. Integration and enhancement of 2-keto-*L*-gulonic acid synthesis pathway in *gluconobacter oxydans* from *Ketogulonicigenium vulgare*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(6):611-616. (in Chinese)
- [19] CAMPBELL L K, BAKER D E, CAMPBELL R K. Miglitol: assessment of its role in the treatment of patients with diabetes mellitus[J]. **The Annals of Pharmacotherapy**, 2000, 34(11):1291-1301.
- [20] ZENG W Z, SHAN X Y, LIU L, et al. Efficient 1,3-dihydroxyacetone biosynthesis in *Gluconobacter oxydans* using metabolic engineering and a fed-batch strategy[J]. **Bioresources and Bioprocessing**, 2022, 9(1):1-11.
- [21] 胡于东, 堵国成, 陈坚, 等. 氧化葡萄糖酸杆菌 WSH-003 中 *D*-山梨醇脱氢酶关键基因的表达分析[J]. 食品与生物技术学报, 2016, 35(6):623-628.  
HU Y D, DU G C, CHEN J, et al. Analysis of *D*-sorbitol dehydrogenase gene in *Gluconobacter oxydans* WSH-003[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(6):623-628. (in Chinese)
- [22] SHI Y Y, LI K F, LIN J P, et al. Engineered expression vectors significantly enhanced the production of 2-keto-*D*-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2015, 63(22):5492-5498.
- [23] SHI L L, LI K F, ZHANG H, et al. Identification of a novel promoter *gHp0169* for gene expression in *Gluconobacter oxydans*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2014, 175:69-74.
- [24] JEUDE M, DITTRICH B, NIEDERSCHULTE H, et al. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2006, 95(3):433-445.
- [25] STÖCKMANN C, MAIER U, ANDERLEI T, et al. The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hansenula polymorpha* screening cultures[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2003, 30(10):613-622.
- [26] THATIPAMALA R, ROHANI S, HILL G A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation[J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 1992, 40(2):289-297.
- [27] LUCHTERHAND B, FISCHÖDER T, GRIMM A R, et al. Quantifying the sensitivity of *G. oxydans* ATCC 621H and DSM 3504 to osmotic stress triggered by soluble buffers[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2015, 42(4):585-600.
- [28] RICHHARDT J, BRINGER S, BOTT M. Role of the pentose phosphate pathway and the Entner-Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013, 97(10):4315-4323.

(责任编辑:李春丽)