

以 D-果糖为原料利用新型异构酶转化生产 D-阿洛糖

柏玮, 朱玥明, 门燕, 李晓波, 何森健, 孙媛霞

天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室, 天津 300308

柏玮, 朱玥明, 门燕, 等. 以 D-果糖为原料利用新型异构酶转化生产 D-阿洛糖. 生物工程学报, 2012, 28(4): 457-465.
Bai W, Zhu YM, Men Y. Bioconversion of D-fructose to D-allose by novel isomerases. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 457-465.

摘要: 稀少糖是自然界中含量稀少、化学合成困难的一类低热量单糖。D-阿洛糖是一种重要的稀少己醛糖, 其具有减少活性自由基、抑制癌细胞增殖等独特的生理学功能。因此, 以微生物发酵生产 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶 (DPE) 和 L-鼠李糖异构酶 (L-RhI) 转化生产 D-阿洛糖, 成为近几年来国际研究的热点之一。文中分别克隆了来源于解纤维梭菌 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 DPE 基因以及来源于枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的 L-RhI 基因, 并分别使其在宿主菌 *B. subtilis* 及大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中得到了表达。进一步利用镍亲和层析和阴离子交换色谱等手段对这两种酶进行了纯化, 并对这两种纯化后酶的转化能力进行了分析测定。结果表明, 以 D-果糖为原料利用两种异构酶依次转化获得 D-阿洛酮糖及 D-阿洛糖, 其两步转化效率分别为 27.34% 和 34.64%。

关键词: D-果糖, D-阿洛酮糖, D-阿洛糖, 生物转化, D-阿洛酮糖-3-差向异构酶, L-鼠李糖异构酶

Bioconversion of D-fructose to D-allose by novel isomerases

Wei Bai, Yueming Zhu, Yan Men, Xiaobo Li, Ken Izumori, and Yuanxia Sun

National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Rare sugar is a kind of important low-energy monosaccharide that is rarely found in nature and difficult to synthesize chemically. D-allose, a six-carbon aldose, is an important rare sugar with unique physiological functions. It is radical scavenging active and can inhibit cancer cell proliferation. To obtain D-allose, the microorganisms deriving D-psicose 3-epimerase (DPE) and L-rhamnose isomerase (L-RhI) have drawn intense attention. In this paper, DPE from

Received: October 28, 2011; **Accepted:** January 11, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31100577), Innovation Key Program of the Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2EWG5).

Corresponding author: Yuanxia Sun. Tel/Fax: +86-22-84861961; E-mail: syx0430@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 31100577), 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (No. KSCX2EWG5) 资助。

Clostridium cellulolyticum H10 was cloned and expressed in *Bacillus subtilis*, and L-RhI from *Bacillus subtilis* 168 was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The obtained crude DPE and L-RhI were then purified through a HisTrap HP affinity chromatography column and an anion-exchange chromatography column. The purified DPE and L-RhI were employed for the production of rare sugars at last, in which DPE catalyzed D-fructose into D-psiicose while L-RhI converted D-psiicose into D-allose. The conversion of D-fructose into D-psiicose by DPE was 27.34%, and the conversion of D-psiicose into D-allose was 34.64%.

Keywords: D-fructose, D-psiicose, D-allose, bioconversion, D-psiicose 3-epimerase, L-rhamnose isomerase

在碳水化合物研究领域, 稀少糖是一类重要的研究内容。国际糖协会 (ISRS) 对稀少糖 (Rare sugar) 的定义为“在自然界中存在但含量极少的一类单糖及其衍生物”^[1]。这类糖大多可作为一种低热量、低吸收的甜味剂, 并具有独特的生理学功能, 在膳食、保健、医药等领域中发挥着非常重要的功能。例如, D-阿洛酮糖可以改善肠道菌群、降低血糖、抗龋齿等^[2-4], D-阿洛糖具有抑制活性氧、抑制癌细胞增殖等功能等^[5]。

日本的研究学者 Izumori^[6]于 2002 年建立了稀少糖的生物转化生产策略, 即 Izumoring 方法。该方法中利用酮糖差相异构酶 (Ketose epimerase)、醛糖异构酶 (Aldose isomerases) 和多元醇脱氢酶 (Poly dehydrogenase) 进行所有单糖及糖醇之间的相互转化。该策略提示给我们一种利用生物转化生产稀少糖的方法, 即利用天然植物成分或食品工业中加工副产物淀粉、乳糖为原料经过现有成熟工艺获得木糖、果糖、半乳糖, 再通过各种酶的作用获得稀少糖。在 Izumoring 策略中, 以天然原料为切入点, 有一条关键的切入途径。即: 淀粉→果糖→D-阿洛酮糖。

D-阿洛酮糖是 D-果糖的 C-3 差相异构体。生物催化转化 D-果糖生产 D-阿洛酮糖, 可以利用的酶包括: D-塔格糖-3-差相异构酶 (D-tagatose 3-epimerase, 缩写为 DTE) 和 D-阿

洛酮糖-3-差相异构酶 (D-psiicose 3-epimerase, 缩写为 DPE)^[7-9]。其中, DTE 的最适底物是 D-塔格糖, 而 DPE 则在底物是 D-阿洛酮糖时发挥最大的催化活力。目前为止被发现并表征的 D-阿洛酮糖生产酶只有两种 DTE^[7,15]和两种 DPE^[8,14]。通过比对发现, 来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 DPE 基因与已经发现的根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 的 DPE 基因具有 60% 的相似性。因此, *C. cellulolyticum* DPE 有潜力成为生产 D-阿洛酮糖的第 5 种 C-3-差相异构酶。

D-阿洛酮糖与 D-阿洛糖之间的相互转化, 是一个醛酮异构反应。1998 年, Bhuivan 等首次利用基因工程获得的假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* 的 L-鼠李糖异构酶 (L-rhamnose isomerase, 缩写为 L-RhI) 进行酶固定化和循环转化生产 D-阿洛糖。将 L-RhI 固定在壳聚糖 BCW-2603 珠载体上, 加入 20% D-阿洛酮糖溶液在 40 °C 条件下进行反应, 最终约 40% 转化为 D-阿洛糖^[10]。然而, L-RhI 的最适底物并不是 D-阿洛酮糖, 而是 L-鼠李糖。大部分的 L-RhI 因此并不具备催化生产 D-阿洛糖的能力, 比如 *Escherichia coli* L-RhI^[11]、苍白芽胞杆菌 *Bacillus halodurans* L-RhI^[12]以及海栖热袍菌 *Thermotoga maritime* L-RhI^[13]。开发新的 L-RhI, 并研究不同来源的 L-RhI 催化生产 D-阿洛糖的机理, 因此变

成一个十分有趣的课题。

本文克隆了来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 *DPE* 基因以及来源于 *Bacillus subtilis* 168 的 *L-Rhl* 基因,并分别使其在宿主菌 *B. subtilis* 及 *E. coli* BL21 (DE3) 中得到了表达。接着,对表达后的 *DPE* 及 *L-Rhl* 进行了纯化。最后对两种重组蛋白的催化转化能力进行了试验。打通了以 D-果糖为原料转化生产 D-阿洛酮糖,最后得到 D-阿洛糖的工艺路径。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 生化试剂

D-果糖、D-阿洛酮糖、D-塔格糖、D-山梨糖、D-阿洛糖等稀少糖均为分析纯试剂,购自 Sigma Aldrich。蛋白胨、酵母粉、琼脂及其他试剂均为分析纯。

1.1.2 菌种与质粒

对于 *DPE* 基因的克隆来说,质粒与宿主菌分别为 pMA5 (2) 及 *B. subtilis* WB600。

对于 *L-Rhl* 基因的克隆来说,质粒与宿主菌分别为 pET-21a (+) 与 *E. coli* BL21 (DE3)。

B. subtilis 及 *E. coli* 的培养基都是 Luria-Bertani (LB) 培养基。

1.2 方法

1.2.1 *DPE* 基因在 *B. subtilis* 中的克隆与表达

根据 *C. cellulolyticum* H10 的 *DPE* 基因序列设计引物:上游引物 pDPEF 和下游引物 pDPER。上下游引 5'端分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 的酶切位点 (表 1)。并在 C 端插入了一段 6×His 标签,以简化其纯化步骤。

DPE 的 PCR 基因片段和表达载体 pMA5 用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行酶切反应。回收后的目的片段与载体用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物 pMA-*DPE* 转化至 *B. subtilis* WB600 中进行克隆,PCR 筛选阳性克隆,并用双酶切鉴定,挑取阳性转化子。

插入 pMA-*DPE* 的重组菌接入 LB-kanamycin 培养基 (kanamycin 终浓度 50 mg/L) 中,37 °C、200 r/min 培养 16 h。

1.2.2 重组 *DPE* 蛋白的纯化

来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 *DPE* 基因通过基因重组在 *B. subtilis* WB600 中表达,经过 3 个步骤对表达产物进行分离纯化,最终达到了电泳纯:

1) 粗提取:离心收集重组菌 10 min (4 °C, 6 000×g),弃去上清,并用 ddH₂O 洗涤菌体 2 次,离心 20 min (4 °C, 12 000 r/min),弃去上清,用

表 1 PCR 引物列表

Table 1 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
pDPEF	GGAATTCCATATGAAACATGGTATATAC	28
pDPER	CGGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGGAGTGTTTATGACA	44
pRHIF	CGCGGATCCATGACCATAAAAAGCCAATTATG	31
pRHIR	CCGCTCGAGGACAATCGGAGAAGATG	26

破碎缓冲液 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 悬浮, 并在冰上超声破碎细胞, 离心 20 min (12 000 r/min, 4 °C)。

2) 镍离子亲和层析: 将上步所得离心上清经 0.45 μm 的膜过滤后, 上样 His-Trap 镍离子螯合柱 (平衡缓冲液: 25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 40 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 以高咪唑含量的缓冲液进行线性洗脱 (25 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)。收集目的蛋白。

3) 离子交换色谱: 将上步所得溶液经超滤脱盐后, 上样 Source 15Q 阴离子交换柱 (GE Healthcare Biosciences) (平衡缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.5), 以高 NaCl 浓度的缓冲液进行线性洗脱 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 6.5)。收集目的蛋白洗脱峰。

最后用 20 mmol/L HEPES (pH 8.0) 的缓冲液将酶溶液超滤脱盐, 并低温保存。

1.2.3 *L-Rhl* 基因在 *E. coli* BL21 中的克隆与表达

根据 *B. subtilis* 168 的 *L-Rhl* 基因序列设计引物: 上游引物 pRHIF 和下游引物 pRHIR。上下游引物 5'端分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 的酶切位点。并在 C 端插入了一段 6 \times His 标签, 以简化其纯化步骤。

L-Rhl 的 PCR 基因片段和表达载体 pET-21a (+) 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行酶切反应。回收后的目的片段与载体用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物 pET-21a-*L-Rhl* 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态中进行克隆, PCR 筛选阳性克隆, 并用双酶切鉴定, 挑取阳性转化子转入 *E. coli*

BL21 进行诱导表达。

插入 pET-21a-*L-Rhl* 的重组菌接入 LB-ampicillin 培养基 (ampicillin 终浓度 100 mg/L) 中, 37 °C、200 r/min 培养 16 h。

1.2.4 重组 *L-Rhl* 蛋白的纯化

经过 3 个步骤对重组 *L-Rhl* 表达产物进行分离纯化, 最终达到了电泳纯:

1) 粗提取: 离心收集重组菌 10 min (4 °C, 6 000 \times g), 弃去上清, 并用 ddH₂O 洗涤菌体 2 次, 离心 20 min (4 °C, 12 000 r/min), 弃去上清, 用破碎缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0.5% 甘油, pH 8.0) 悬浮, 并在冰上超声破碎细胞, 离心 20 min (12 000 r/min, 4 °C)。

2) 镍离子亲和层析: 将上步所得离心上清经 0.45 μm 的膜过滤后, 上样 His-Trap 镍离子螯合柱 (平衡缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0.5% 甘油, pH 8.0), 以高咪唑含量的缓冲液进行线性洗脱 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L NaCl, 0.5% 甘油, 200 mmol/L 咪唑 pH 8.0)。收集目的蛋白。

3) 离子交换色谱: 将上步所得溶液经超滤脱盐后, 上样 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱 (GE Healthcare Biosciences) (平衡缓冲液: 20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.0), 以高 NaCl 浓度的缓冲液进行线性洗脱 (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 6.0)。收集目的蛋白洗脱峰。

最后用 50 mmol/L Glycine-NaOH (pH 9.0) 的缓冲液将酶溶液超滤脱盐, 并低温保存。

本文所有纯化步骤所用系统均为 ÄKTA PurifierTM 100 (GE Healthcare Biosciences)。

1.2.5 DPE 催化 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖

底物溶液的配制：在 20 mmol/L HEPE (pH 8.0) 的缓冲液中，加入 D-果糖，配成终浓度 10 g/L 的溶液。

在 500 μ L 的底物溶液中加入 2.5 μ g 纯化后的 DPE，于 50 $^{\circ}$ C 的金属浴中反应。在 100 $^{\circ}$ C 的沸水浴中加热 5 min 终止反应。

1.2.6 L-RhI 催化 D-阿洛酮糖转化为 D-阿洛糖

底物溶液的配制：在 50 mmol/L Glycine- NaOH (pH 9.0) 的缓冲液中，加入 1 mmol/L $MnCl_2$ ，再加入 D-阿洛酮糖，配成终浓度 10 g/L 的溶液。

在 1 mL 的底物溶液中加入 49.0 μ g 纯化后的 L-RhI 酶液，于 60 $^{\circ}$ C 的金属浴中反应。终止反应时加入 100 μ L 三氯乙酸 (10%)。

1.2.7 糖的检测

仪器为安捷伦高效液相色谱仪 1200，分析柱：安捷伦 Zorbax 糖分析柱，流动相：75%乙腈 (以 D-果糖为底物生成 D-阿洛酮糖) 或 78%乙腈 (以 D-阿洛酮糖为底物生成 D-阿洛糖)，流速：1 mL/min，柱温：30 $^{\circ}$ C，检测器：示差折光检测器。以 Sigma 公司生产的 D-果糖、D-阿洛酮糖和 D-阿洛糖纯品为标准品，将上例得到的样品进行分析，上样量为 5 μ L。

2 结果与分析

2.1 DPE 基因的表达与纯化

已有研究报道了来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 DPE 基因在 *E. coli* 中的表达^[11]。然而结果表明，DPE 在 *E. coli* 中的表达量有限，并且表达产物大部分是包涵体，不能直接用于糖反应。这对 DPE 基因的表达体系提出了一个新的挑战。用枯草芽胞杆菌作宿主菌，有以下几个优点：

1) 枯草芽胞杆菌表达体系不需要诱导物的加入，一方面节约了成本，另一方面免去某些诱导物对人体的毒害；2) 利用枯草芽胞杆菌，可以构建分泌型的表达系统，将目的蛋白分泌到细胞外部，从而不再需要细胞的破碎步骤，简化了操作流程；3) 枯草芽胞杆菌是革兰氏阳性细菌，其细胞膜不均含有内毒素，对人体无害，是一种公认的食品级微生物。

本文以枯草芽胞杆菌为宿主菌，对 DPE 基因进行了表达。由于 DPE 基因在组成型表达启动子 *Hpa* II 的调控之下，故不需要外源诱导物的加入。如图 1 所示，与空载体对照，有明显的目的蛋白条带 (33 kDa)，且有大量的可溶性蛋白。

重组 DPE 蛋白经过 His TrapHP 亲和色谱以及 Source15Q 阴离子交换色谱之后，纯度达到了

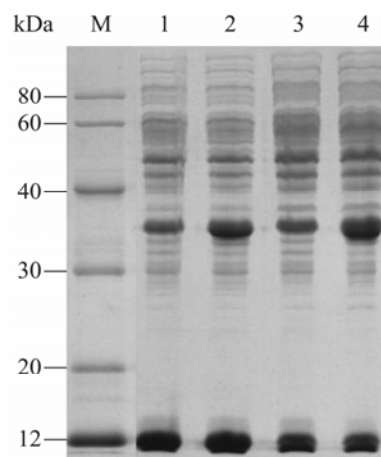


图 1 DPE 基因在 *B. subtilis* 中表达的 SDS-PAGE 结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of DPE expressed in *B. subtilis*. M: protein marker; 1: total cell lysate obtained from a non-expression control of *B. subtilis* transformed with pMA5; 2: total cell lysate obtained from *B. subtilis* transformed with pMA5-DPE; 3: the soluble supernatant of *B. subtilis* transformed with pMA5; 4: the soluble supernatant of *B. subtilis* transformed with pMA5-DPE.

电泳纯, 如图 2 所示。重组 DPE 蛋白的理论分子量约 33 kDa, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12% SDS-PAGE) 的结果显示, 目的蛋白条带大小符合预期。

2.2 *L-RhI* 基因的表达与纯化

将空载体 pET-21a (+) 转化到 *E. coli* BL21 中, 作为对照与 *B. subtilis* pET-21a-L-RhI 同批培养并诱导表达。由图 3 可知, 经 IPTG 诱导, pET-21a-L-RhI 有明显的目的蛋白条带 (49 kDa)。将菌体破碎后, 分别取上清及沉淀进行蛋白电泳后发现, 表达产物大量为可溶性蛋白, 包涵体较少。

重组 L-RhI 蛋白经过 His TrapHP 亲和色谱以及 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱之后, 纯度达到了电泳纯, 如图 4 所示。重组 DPE 蛋白的理论分子量约 49 kDa, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (12% SDS-PAGE) 的结果显示, 目的蛋白条带大小符合预期。

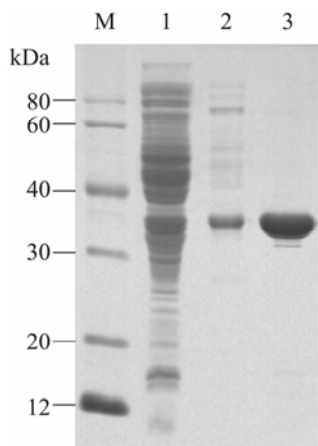


图 2 重组 DPE 蛋白的纯化

Fig. 2 Purification of the recombinant DPE expressed in *B. subtilis*. M: protein marker; 1: the soluble supernatant of *B. subtilis* transformed with pMA5-DPE; 2: recombinant DPE purified through Ni column; 3: recombinant DPE purified through Source 15Q column.

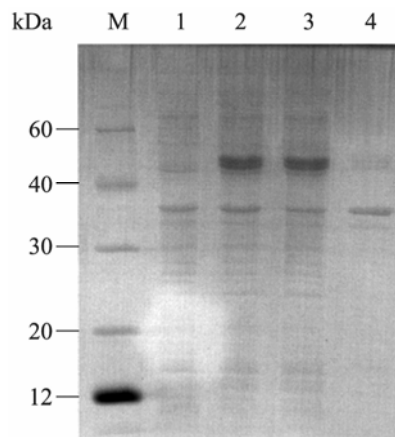


图 3 *L-RhI* 基因在 *E. coli* 中表达的 SDS-PAGE 结果
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of DPE expressed in *E. coli*. M: protein marker; 1: total cell lysate obtained from a non-expression control of *E. coli* BL21 transformed with pET-21a (+); 2: total cell lysate obtained from *E. coli* BL21 transformed with pET-21a-L-RhI; 3: the soluble supernatant of *E. coli* BL21 transformed with pET-21a-L-RhI; 4: the inclusion body of *E. coli* BL21 transformed with pET-21a-L-RhI.

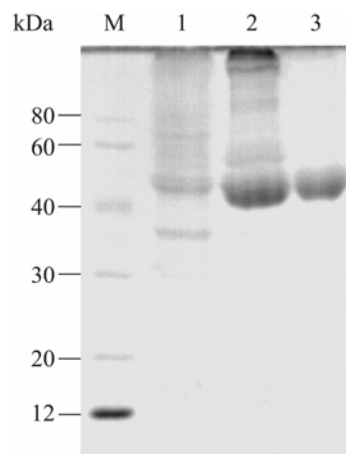


图 4 重组 L-RhI 蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of the recombinant L-RhI expressed in *E. coli*. M: protein markers; 1: the soluble supernatant of *E. coli* transformed with pET-21a-L-RhI; 2: recombinant L-RhI purified through Ni column; 3: recombinant L-RhI purified through DEAE Sepharose Fast Flow column.

2.3 以 D-果糖为底物催化生产 D-阿洛糖

D-阿洛酮糖是 D-果糖的 C-3 差相异构体。D-阿洛糖与 D-阿洛酮糖互为醛酮异构体。从 D-果糖到 D-阿洛糖的转化,需经过两步异构化反应(图 5)。自从 2002 年 Izumoring 策略揭示出了以廉价的果糖生产 D-阿洛糖的可能性,许多的研究都致力于找到合适的异构酶来完成这两步转化反应。

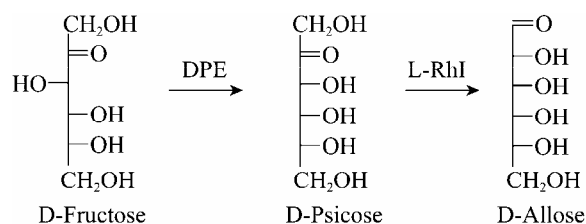


图 5 D-果糖、D-阿洛酮糖与 D-阿洛糖间的转化方程式

Fig. 5 Reaction scheme among D-fructose, D-psicose and D-allose.

2.3.1 DPE 催化 D-果糖生产 D-阿洛酮糖

来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 DPE 具备催化生产 D-阿洛酮糖的催化活力(图 6)。在 50 °C 反应 1 h 后,反应即达到了平衡。此时, D-果糖的转化率为 27.34%。本文还试验了大批量地生产 D-阿洛酮糖,在底物溶液中加入 500 g/L 的 D-果糖,反应的最终转化率也可以达到 24.83%。

实验证明,重组 *C. cellulolyticum* DPE 适用于 D-阿洛酮糖的生产。其一,其催化反应速率高,能短时间达到反应平衡;其二,其表达宿主菌是枯草芽胞杆菌,符合食品生产的安全需求。

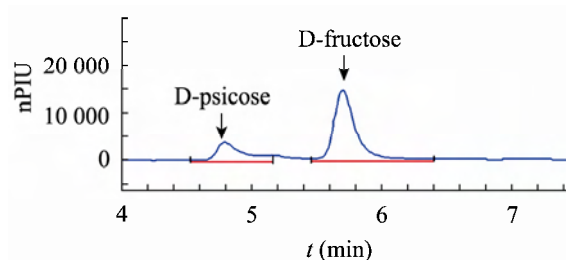


图 6 以 D-果糖为底物反应 1 h 后反应液的液相色谱图
Fig. 6 HPLC of the reactants after 1 hour's reaction using D-fructose as the substrate.

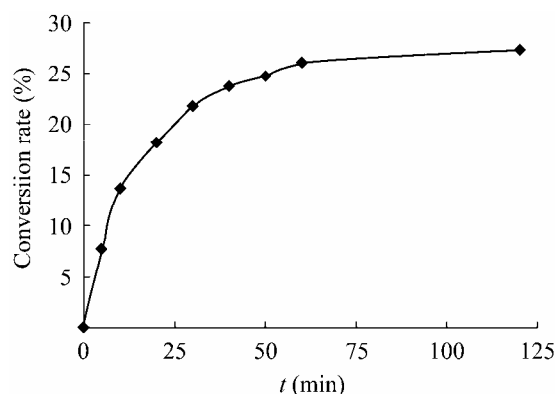


图 7 催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的反应过程曲线
Fig. 7 Bioconversion of D-fructose into D-psicose using the purified DPE.

2.3.2 L-RhI 催化 D-阿洛酮糖生产 D-阿洛糖

L-RhI 是一种醛酮异构酶,它可以催化 D-阿洛酮糖生产 D-阿洛糖。但不是所有来源的 L-RhI 都具备这种催化活力,它的最适底物是 L-鼠李糖。目前为止,以 D-阿洛酮糖为底物生产 D-阿洛糖的 L-RhI 都源自假单胞菌 *P. stutzeri*。

来源于 *B. subtilis* 168 的 L-RhI (GenBank Accession No. AL009126.3) 与 *P. stutzeri* L-RhI (GenBank Accession No. AB121136.1) 的氨基酸序列相似度不高,只有 17.23%。然而,实验结果发现, *B. subtilis* 168 L-RhI 具有一定的催化生产 D-阿洛糖的能力。如图 8 所示,在 60 °C 反应

24 h 后, 有明显的产物峰 D-allose 生成, 此时并无其他明显的产物峰, D-psicose 的转化率为 34.64%。反应 48 h 后达到了平衡, 此时底物转化率为 37.51% (图 9)。

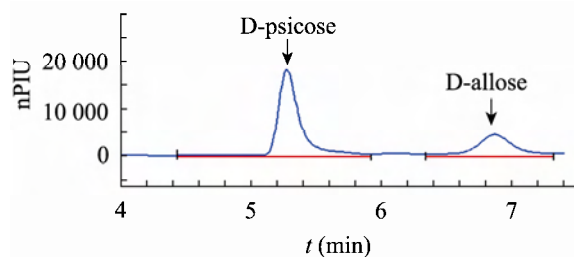


图 8 以 D-阿洛酮糖反应 24 h 后反应液的液相图
Fig. 8 HPLC of the reactants after 24hs' reaction using D-psicose as the substrate.

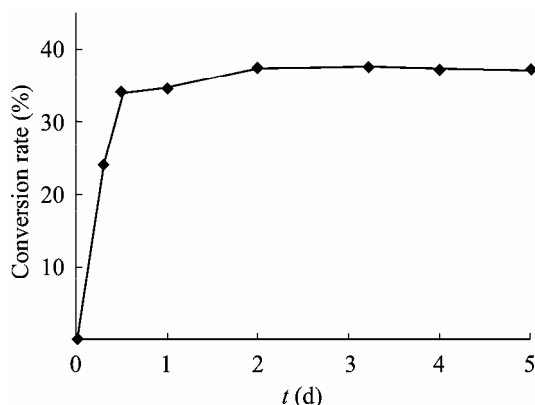


图 9 催化 D-阿洛酮糖生成 D-阿洛糖的反应过程曲线
Fig. 9 Bioconversion of D-psicose into D-allose using the purified L-RhI.

3 结论

本研究将来源于 *C. cellulolyticum* H10 的 DPE 基因克隆到了宿主菌 *B. subtilis* 中, 没有添加任何的外源诱导物, 即实现了重组 DPE 蛋白的高效表达。表达后的重组 DPE 蛋白经过镍亲

和层析和阴离子交换色谱等方法纯化, 纯度达到了电泳纯。纯化后的 DPE 能高效地催化 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖, 反应 1 h 即可达到转化率 27.34% 的反应平衡。

研究还克隆了来源于 *Bacillus subtilis* 168 的 *L-RhI* 基因, 并使其在宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3) 中得到了表达。纯化后的重组 L-RhI 达到了电泳纯, 并具有催化 D-阿洛酮糖生成 D-阿洛糖的催化活力。

实验证明, 利用 DPE 和 L-RhI 可以将来源丰富的 D-果糖经过 D-阿洛酮糖转化生成 D-阿洛糖, 实现了稀少糖的生物转化。

REFERENCES

- [1] Izumori K. Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*, 2002, 89(3): 120-124.
- [2] Matsuo T, Suzuki H, Hashiguchi M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats. *Nutritional Vitamins*, 2002, 48(1): 77.
- [3] Matsuo T, Baba Y, Hashiguchi M, et al. Dietary D-psicose, a C-3 epimer of D-fructose, suppresses the activity of hepatic lipogenic enzymes in rats. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2001, 10(3): 233-237.
- [4] Matsuo T, Izumori K. Effects of dietary D-psicose on diurnal variation in plasma glucose and insulin concentrations of rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70(9): 2081-2085.
- [5] Murata A, Sekiya K, Watanabe Y, et al. A novel inhibitory effect of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. *J Biosci Bioeng*, 2003, 96(1): 89-91.
- [6] Izumori K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses. *J Biotechnol*, 2006, 124(4): 717-722.
- [7] Ishida Y, Kamiya T, Izumori K. Production of D-tagatose 3-epimerase of *Pseudomonas cichorii*

- ST-24 using recombinant *Escherichia coli*. *J Ferment Bioeng*, 1997, 84(4): 348–350.
- [8] Kim NH, Kim HJ, Kang DI, et al. Conversion shift of D-fructose to D-psicose for enzyme-catalyzed epimerization by addition of borate. *Appl Environ Microb*, 2008, 74(10): 3008–3013.
- [9] Takeshita K, Suga A, Takata G, et al. Mass production of d-psicose from d-fructose by a continuous bioreactor system using immobilized d-tagatose 3-epimerase. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90(4): 453–455.
- [10] Bhuiyan SH, Itami Y, Rokui Y, et al. D-allose production from d-psicose using immobilized l-rhamnose isomerase. *J Ferment Bioeng*, 1998, 85(5): 539–541.
- [11] Korndörfer IP, Fessner WD, Matthews BW. The structure of rhamnose isomerase from *Escherichia coli* and its relation with xylose isomerase illustrates a change between inter and intra-subunit complementation during evolution. *J Mol Biol*, 2000, 300(4): 917–933.
- [12] Doan TNT, Prabhu P, Kim JK, et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of l-rhamnose isomerase with a novel high thermostability from *Bacillus halodurans*. *Acta Cryst*, 2010, F66(6): 677–680.
- [13] Park CS, Yeom SJ, Lim YR, et al. Characterization of a recombinant thermostable l-rhamnose isomerase from *Thermotoga maritima* ATCC 43589 and its application in the production of l-lyxose and l-mannose. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(12): 1947–1953.
- [14] Mu WM, Chu FF, Xing QC, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10. *J Agric Food Chem*, 59(14): 7785–7792.
- [15] Zhang LT, Mu WM, Jiang B, et al. Characterization of d-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts d-fructose into d-psicose. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(6): 857–862.