

甲醛多酶级联合成 L-苏糖醇的反应体系优化

张如珂^{1,2}, 谭子斌², 魏金霞¹, 朱蕾蕾^{2*}

1 天津中医药大学, 天津

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津

张如珂, 谭子斌, 魏金霞, 朱蕾蕾. 甲醛多酶级联合成 L-苏糖醇的反应体系优化[J]. 微生物学报, 2026, 66(9): 4601-4613.
ZHANG Ruke, TAN Zijian, WEI Jinxia, ZHU Leilei. Optimization of the multi-enzyme cascade for synthesis of L-threitol from formaldehyde[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(9): 4601-4613.

摘要: L-苏糖醇(L-threitol)是一种重要的药物合成中间体。本课题组前期开发了以甲醛为原料的一锅两步多酶级联合成路线, 该路线由甲醛裂合酶(benzoylformate decarboxylase, BFD)、D-果糖-6-磷酸醛缩酶(fructose-6-phosphate aldolase, FSA)催化甲醛生成 L-赤藓酮糖(L-erythrulose), 在 L-苏糖醇脱氢酶(L-threitol dehydrogenase, TDH)和甲醇脱氢酶(methanol dehydrogenase, MDH)/异丙醇辅酶循环体系的驱动下, 将 L-赤藓酮糖还原为 L-苏糖醇。该路线具有原子经济性高、副产物少的优势, 但亟需优化各酶的适配性及最佳浓度。【目的】系统优化甲醛转化为 L-苏糖醇的多酶级联反应体系中各酶的用量及适配性, 提升反应速率与转化率。【方法】通过对反应途径中的 BFD、FSA、TDH 和 MDH 4 个关键酶进行酶活评估, 进而对酶用量、辅酶循环体系、反应时间及反应温度等进行逐步优化, 有效提升了反应体系中各因素的适配性。【结果】最佳反应条件: BFD、FSA、TDH 及 MDH 的酶用量分别为 10、1、1、8 mg/mL, 其中 FSA、TDH 用量较优化前分别降低 87% 和 67%; 辅酶 NAD⁺用量为 2 mmol/L, 反应温度 30 °C, 反应时长仅需 8 h, 较原体系大幅缩短了 60%。在此最优条件下, L-苏糖醇产量最高达 166.76 mmol/L, 产率为 89%。放大实验中 L-苏糖醇产率仍保持在 80%, 较优化前提升了 43%。【结论】本研究通过对多酶体系中酶的适配性及反应条件的系统优化, 显著降低了甲醛转化为 L-苏糖醇的关键酶用量并缩短了反应时间, 同时大幅提高了 L-苏糖醇的生成效率与产率, 为酶法催化甲醛合成 L-苏糖醇的工业化应用奠定了重要基础。

关键词: 甲醛; 多酶级联反应; L-苏糖醇; 体系优化

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDC0120200); 天津市科技重大专项与工程项目(25ZXWCSY00230); 国家自然科学基金(32471548)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDC0120200), the Tianjin Major Science and Technology Project and Engineering Project (25ZXWCSY00230), and the National Natural Science Foundation of China (32471548).

*Corresponding author. E-mail: zhu_ll@tib.cas.cn

Received: 2026-02-02; Accepted: 2026-03-18; Published online: 2026-04-02

Optimization of the multi-enzyme cascade for synthesis of L-threitol from formaldehyde

ZHANG Ruke^{1,2}, TAN Zijian², WEI Jinxia¹, ZHU Leilei^{2*}

¹ Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, China

² State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin, China

Abstract: L-threitol is a significant intermediate in pharmaceutical synthesis. Previously, we developed a one-pot, two-step multi-enzyme cascade for synthesizing L-threitol from formaldehyde. In this pathway, benzoylformate decarboxylase (BFD) and fructose-6-phosphate aldolase (FSA) catalyze the conversion of formaldehyde into L-erythrulose. This is followed by the reduction of L-erythrulose to L-threitol, driven by L-threitol dehydrogenase (TDH) and a methanol dehydrogenase (MDH)/isopropanol cofactor regeneration system. While this route boasts high atom economy and minimal by-products, the compatibility and optimal concentrations of the enzymes required optimization. **[Objective]** To systematically optimize the dosages and compatibility of enzymes in the multi-enzyme cascade to enhance both the reaction rate and conversion efficiency. **[Methods]** The activities of four key enzymes—BFD, FSA, TDH, and MDH—were assessed. Subsequently, factors including enzyme dosage, the cofactor regeneration system, reaction duration, and temperature were optimized step-by-step to improve the system compatibility. **[Results]** The optimal reaction conditions were determined as follows: enzyme dosages of BFD, FSA, TDH, and MDH being 10, 1, 1, and 8 mg/mL, respectively. Notably, the dosages of FSA and TDH were reduced by 87% and 67%, respectively, compared with pre-optimization levels. Other optimal parameters included a NAD^+ concentration of 2 mmol/L, a reaction temperature of 30 °C, and reaction duration of 8 h (representing a 60% decrease from that of the original system). Under these conditions, the maximum L-threitol concentration reached 166.76 mmol/L, with a yield of 89%. In a scale-up experiment, the L-threitol yield remained at 80%, representing a 43% increase compared with the pre-optimization level. **[Conclusion]** By systematically optimizing enzyme compatibility and reaction conditions, this study significantly reduces the enzyme dosages and reaction duration for converting formaldehyde to L-threitol. Simultaneously, it substantially improves the production efficiency and yield, establishing a robust foundation for the enzymatic synthesis of L-threitol from formaldehyde.

Keywords: formaldehyde; multi-enzyme cascade; L-threitol; reaction system optimization

苏糖醇(threitol)是一种四碳糖醇, 化学式为 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_4$, 其分子中 C2 和 C3 位分别为手性中心, 因而具有 3 种立体异构体: 一对对映异构体, 即 D-苏糖醇[(2*R*,3*R*)-丁烷-1,2,3,4-四醇]和

L-苏糖醇[(2*S*,3*S*)-丁烷-1,2,3,4-四醇], 以及一个内消旋体, 即赤藓糖醇[(2*R*,3*S*)-丁烷-1,2,3,4-四醇] (图 1)。其中, D-苏糖醇和赤藓糖醇常作为低热量甜味剂被广泛研究与应用^[1-2]; 而 L-苏糖

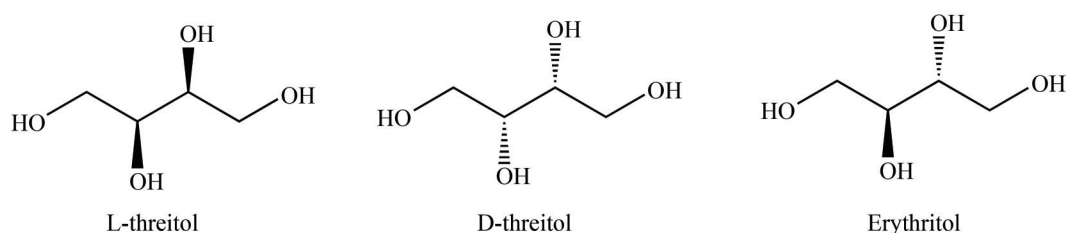


图1 L-苏糖醇、D-苏糖醇、赤藓糖醇的结构式

Figure 1 Structures of L-threitol, D-threitol, and erythritol.

醇则在医药领域具有重要价值, 例如作为合成抗肿瘤药物曲奥舒凡(treosulfan, 即 L-苏糖醇-1,4-双甲基磺酸盐)的关键中间体^[3], 该药物在临床上用于卵巢癌、淋巴瘤等实体瘤和多发性硬化症的治疗^[4-7]。此外, L-苏糖醇还可通过保护/衍生化反应制得 2,3-*O*-异亚丙基-L-苏糖醇和 1,4-二-*O*-苄基-L-苏糖醇等重要手性砌块及原料^[8-10]。另一类重要衍生物为苏糖醇-神经酰胺(threitol-ceramide, ThrCer), 它是恒定自然杀伤 T 细胞(invariant natural killer T cells, iNKT 细胞)的细胞激动剂 α -半乳糖神经酰胺的类似物^[11]。该类分子以 L-苏糖醇作为“头基”, 连接至鞘氨醇/酰基链上, 构成非糖类脂质结构^[12]。此类分子被设计为分化群 1d (cluster of differentiation 1d, CD1d)配体, 能够特异性激活 iNKT 细胞, 从而实现快速、可控的免疫应答启动与调节^[13]。

L-苏糖醇的合成主要采用化学方法。其中, 以 L-酒石酸为起始原料的合成路径较为典型^[14-15]。该路径中, L-酒石酸先经酯化生成二乙酯, 再经丙酮保护形成异丙叉衍生物, 随后利用 LiAlH_4 对分子内酯键进行氢化还原, 最后通过酸水解得到 L-苏糖醇(图 2A)。然而, 此方法反应步骤较多且工艺过程冗长, 不利于放大生产。另一合成路径是通过双烯氧化二羟基化反应(dihydroxylation), 将丁二烯中的双键氧化为四羟基丁烷中间体, 再进一步转化为 L-苏糖醇^[16](图 2B)。然而, 该路线的原料丁二烯主要为工业烯烃中间体, 多用于合成橡胶^[17]而非糖醇衍生物; 且生成四羟基丁烷中间体后需进行

立体异构体分离方可进行后续反应, 显著增加了工艺的复杂性与生产成本; 此外, 反应中使用的催化剂四氧化锇(OsO_4)价格昂贵, 且易对眼睛造成损伤^[18], 探索清洁、高效且可持续的生物合成途径已成为生物制造领域的重要研究方向。因此, 目前苏糖醇合成的研究更加侧重于发展绿色、高效、低成本的工业化生产路线。

本课题组在前期研究中构建了一条以甲醛为底物的体外多酶级联途径, 并通过一锅两步酶促反应策略实现了 L-苏糖醇的合成^[19]。合成路线如图 2C 所示, 具体过程可分为 2 个阶段: 第一阶段(Step 1)以甲醛为起始底物, 首先经甲醛裂合酶突变体(benzoylformate decarboxylase mutant 6, BFD-M6)催化生成 1,3-二羟基丙酮(1,3-dihydroxyacetone, DHA), 随后利用 D-果糖-6-磷酸醛缩酶突变体($\text{FSA}^{\text{A129S}}$)催化 DHA 与一分子甲醛缩合, 得到中间产物 L-erythrulose。第二阶段(Step 2)以 L-赤藓酮糖(L-erythrulose)为底物, 在 L-苏糖醇脱氢酶(NsTDH)催化下, 以 NADH 为辅酶, 将其还原为 L-苏糖醇; 同时利用甲醇脱氢酶(BsMDH)催化异丙醇氧化, 实现 NADH 再生与辅酶循环。为驱动反应完全进行并获得高产率, 前期采用了高酶载量的策略, 导致各酶用量较高, 该反应路径涉及的 4 种酶添加量分别为: BFD-M6 7.5 mg/mL、 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 7.5 mg/mL、 NsTDH 3 mg/mL 和 BsMDH 5 mg/mL, 总酶量达 23 mg/mL。

为进一步节约生产成本并提升反应效率,

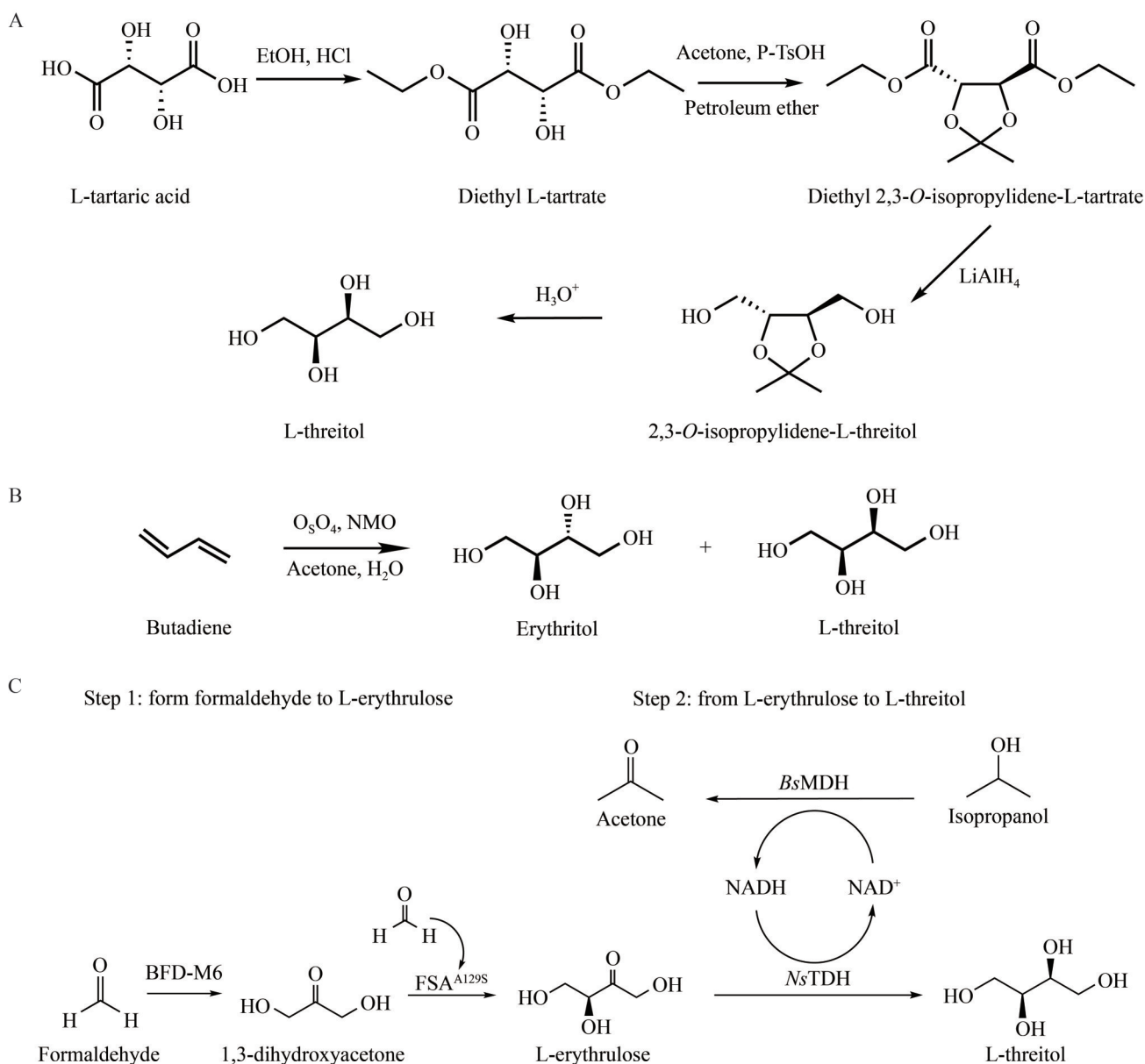


图2 L-苏糖醇的常见制备路线^[14-16]及本研究使用的多酶级联合成路线

Figure 2 Conventional synthetic routes of L-threitol^[14-16] and multi-enzyme cascade for the synthesis of L-threitol in this study. A: From L-tartaric acid to L-threitol; B: From butadiene to L-threitol; C: Multi-enzyme cascade for the synthesis of L-threitol.

本研究对该 L-苏糖醇合成路径中各酶的适配性及各步骤反应关键参数，包括酶用量、反应时间、辅酶类型和反应温度进行了系统优化，旨在为基于甲醛酶法合成 L-苏糖醇的工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

本研究所用的菌株和质粒如表 1 所示。

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Source
Strains		
BL21-Gold (DE3)	$F^-ompT hsdS (r_B^-m_B^-)$ gal dcm^+ (DE3)	Lab collection
BL21-pET28a	BL21-Gold (DE3) with pET28a	Lab collection
BL21-BFD-M6	BL21-Gold (DE3) with pET28a- <i>BFD-M6</i>	Lab collection
BL21-FSA ^{A129S}	BL21-Gold (DE3) with pET28a- <i>FSA</i> ^{A129S}	Lab collection
BL21- <i>BsMDH</i>	BL21-Gold (DE3) with pET28a- <i>BsMDH</i>	Lab collection
BL21- <i>NsTDH</i>	BL21-Gold (DE3) with pET28a- <i>NsTDH</i>	Lab collection
Plasmids		
pET28a	pBR322 ori with PT7; KanR	Lab collection
pET28a-BFD-M6	pET28a vector, <i>NdeI-BFD-M6-XhoI</i>	Lab collection
pET28a-FSA ^{A129S}	pET28a vector, <i>NdeI-FSA</i> ^{A129S} - <i>XhoI</i>	Lab collection
pET28a- <i>BsMDH</i>	pET28a vector, <i>NdeI-BsMDH-XhoI</i>	Lab collection
pET28a- <i>NsTDH</i>	pET28a vector, <i>NdeI-NsTDH-XhoI</i>	Lab collection

1.1.2 主要试剂和仪器

质粒提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), 北京索莱宝科技有限公司; 硫酸卡那霉素(kanamycin sulfate, Kan)、甲醛溶液, 阿拉丁试剂(上海)有限公司。

ÄKTA 蛋白纯化系统, Cytiva 公司; 高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC), Agilent 公司; 酶标仪, 美谷分子仪器有限公司。

1.2 培养基与培养方法

1.2.1 培养基

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, 用于种子液的培养。

TB 培养基(g/L): 酵母提取物 12.0, 胰蛋白胨 24.0, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 16.4, KH_2PO_4 2.3, 甘油 4.0, 用于菌株培养与表达。

1.2.2 培养方法

种子液培养: 取 100 mL 摇瓶, 装入 20 mL LB 培养基, 加入 50 μ g/mL Kan, 37 °C、220 r/min 培养 12 h。

摇瓶培养与诱导: 将 1% 种子液接入装有 500 mL TB 培养基的 2 L 摇瓶中, 加入 50 μ g/mL Kan, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 达 0.6–0.8, 加入 0.1 mmol/L IPTG, 于 20 °C 诱导表达 22 h。诱导结束后, 于 4 °C、4 000 r/min 离心 25 min 收集菌体, 将菌体保存于–80 °C。

1.3 酶的纯化

以洗杂缓冲液 (50 mmol/L KH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 按菌体湿重 20 倍的比例充分重悬诱导表达后的菌体。于 4 °C、 7×10^7 – 8×10^7 Pa 压力下, 利用低温高压匀浆破碎机破碎菌体, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 45 min, 收集上清粗酶液。

粗酶液经 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后, 利用 ÄKTA 蛋白纯化系统, 以 2 mL/min 的流速上样至预先用洗杂缓冲液平衡的 Ni^{2+} 亲和层析柱。以含 50 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液 (50 mmol/L KH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 与洗杂缓冲液进行梯度洗脱, 收集目的蛋白洗脱峰。最后, 利用 HiTrap Desalting 26/10 脱盐柱对洗脱液进行脱盐处理, 将缓冲液置换为磷酸钾缓冲液 (50 mmol/L KH_2PO_4 和

K₂HPO₄·3H₂O, 5 mmol/L MgSO₄, pH 7.4)。

1.4 酶活性测定

为避免反应过程中甲醛、异丙醇等的挥发,小体系反应在 EP 管中盖紧管盖并以 Parafilm 封口膜缠绕密封;大体系反应在三角瓶中以聚乙烯(polyethylene, PE)膜多层包裹密封。

1.4.1 酶制剂的制备与保存

为最大限度减少批次间差异、保证实验一致性,本研究部分条件优化实验采用同批次纯化后冻干的酶制剂。具体而言,各酶在初次纯化时均过量制备,测定新鲜酶比活力并完成参照实验后将剩余酶液冷冻干燥,于-80 °C保存备用。每次使用前将冻干酶粉复溶,测定其实际活性,并按与新鲜纯化酶液等酶活单位的原则调整添加量。最终的最优条件验证实验采用新鲜酶液进行。

1.4.2 甲醛裂合酶(BFD-M6)酶活测定

甲醛底物浓度选择 1 500 mmol/L,依据为前期工作中对不同甲醛浓度(900、1 200、1 500、2 100 mmol/L)的系统考察。结果表明,当甲醛浓度为 1 500 mmol/L 时 L-苏糖醇产率最高,达 89.4%^[19]。BFD-M6 酶活测定的反应体系为 300 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4, 5 mmol/L MgSO₄),依次加入 1 mmol/L 焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate, TPP)和终浓度为 2 mg/mL 的 BFD-M6^[20]纯化酶液,最后加入 1 500 mmol/L 甲醛启动反应。于 30 °C、1 000 r/min 恒温振荡,分别于反应 15 min 和 30 min 时取样,样品经 3 kDa 超滤管离心去除酶蛋白并终止反应,滤液经 HPLC 测定产物 1,3-二羟基丙酮(DHA)浓度。BFD-M6 活力定义为:在 pH 7.4、30 °C 条件下,每分钟催化生成 1 μmol DHA 所需的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

1.4.3 D-果糖-6-磷酸醛缩酶突变体(FSA^{A129S})酶活测定

反应在 300 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH

7.4, 5 mmol/L MgSO₄)体系中进行,依次加入 375 mmol/L DHA 和纯化后的 FSA^{A129S}^[21]酶液(终浓度分别为 0.1 mg/mL 和 0.2 mg/mL),最后加入 375 mmol/L 甲醛启动反应。于 30 °C、1 000 r/min 恒温振荡,分别于反应 15 min 和 30 min 时取样,样品经 3 kDa 超滤管离心去除酶蛋白并终止反应,滤液经 HPLC 测定产物 L-赤藓酮糖浓度。FSA^{A129S}活力定义为:在 pH 7.4、30 °C 条件下,每分钟催化生成 1 μmol L-赤藓酮糖所需的酶量定义为 1 个活力单位(U)。

1.4.4 L-苏糖醇脱氢酶(NsTDH)酶活测定

反应体系为 100 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4, 5 mmol/L MgSO₄),首先加入 50 μL 含 375 mmol/L L-赤藓酮糖和 2 mmol/L NADH 的预混溶液,最后加入 50 μL 终浓度为 0.025 mg/mL 的 NsTDH [Ns: 念珠藻属(*Nostoc* sp.)]^[19]纯化酶液启动反应。于 30 °C 条件下,用酶标仪连续监测 340 nm 处吸光度的变化(采样间隔 8 s)。NsTDH 活力定义为:在 pH 7.4、30 °C 条件下,每分钟氧化 1 μmol NADH 所需的酶量定义为 1 个活力单位(U)。NADH 的定量基于在相同反应条件下建立的标准曲线。

1.4.5 甲醇脱氢酶(BsMDH)酶活测定

反应体系为 100 μL 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4, 5 mmol/L MgSO₄),首先加入 50 μL 含 375 mmol/L 异丙醇和 2 mmol/L NAD⁺的预混溶液,最后加入 50 μL 终浓度为 0.25 mg/mL 的 BsMDH [Bs: 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)]^[22]纯化酶液启动反应。于 30 °C 条件下,用酶标仪连续监测 340 nm 处吸光度变化(采样间隔 8 s)。BsMDH 活力定义为:在 pH 7.4、30 °C 条件下,每分钟还原 1 μmol NAD⁺所需的酶量定义为 1 个活力单位(U)。NADH 的定量是基于相同反应条件下建立的标准曲线。

1.5 检测方法

1.5.1 标准曲线的配制

L-赤藓酮糖(L-erythrulose)、L-苏糖醇

(L-threitol)和 DHA 分别用 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4, 5 mmol/L MgSO₄)配制成 1 mol/L 母液, 并稀释为 3–400 mmol/L 的梯度标准溶液, 经 HPLC 检测绘制标准曲线。

1.5.2 HPLC 检测条件

HPX-87H 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 8 μm), 流动相为 5 mmol/L 稀硫酸, 流速 0.6 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 40 °C; 检测器: 紫外检测器(检测波长 210 nm)和示差折光检测器。ChromCore Sugar-10Ca 色谱柱(300 mm×7.8 mm, 8 μm), 流动相为纯水, 流速 0.4 mL/min, 进样量 20 μL, 柱温 55 °C; 检测器: 示差折光检测器。

2 结果与分析

2.1 BFD-M6、FSA^{A129S}、NsTDH 和 BsMDH 的表达与纯化

通过镍柱亲和层析对 4 个关键酶进行纯化, 结果显示均获得了较高纯度的蛋白溶液(图 3A、3B), 可直接用于后续酶级联反应。

2.2 BFD-M6、FSA^{A129S}、NsTDH 和 BsMDH 的酶活测定

对 BFD-M6、FSA^{A129S}、NsTDH 和 BsMDH 4 个关键酶进行酶活测定, 结果如表 2 所示。L-苏糖醇合成第一阶段所用的 2 个酶中, FSA^{A129S} 的比活力远高于 BFD-M6 (约 31 倍), 说明 FSA^{A129S} 酶用量有较大的优化空间。第二阶段中, NsTDH 的比活力远高于 BsMDH (24 倍), 说明 NsTDH 酶用量有较大的优化空间。

2.3 酶用量优化

2.3.1 转化甲醛为 L-赤藓酮糖的酶量优化

第一阶段反应以甲醛为底物, 经两步酶催化生成中间产物 L-赤藓酮糖。首先, 为优化第一步甲醛缩合反应的酶用量, 考察了不同浓度 BFD-M6 蛋白(2、4、6、8、10 mg/mL)在 1 500 mmol/L 甲醛及 7.5 mg/mL FSA^{A129S} 纯酶条件下, 反应 5 h 和 10 h 时体系中 L-赤藓酮糖的生成情况。如图 4 所示, 当 BFD-M6 蛋白浓度

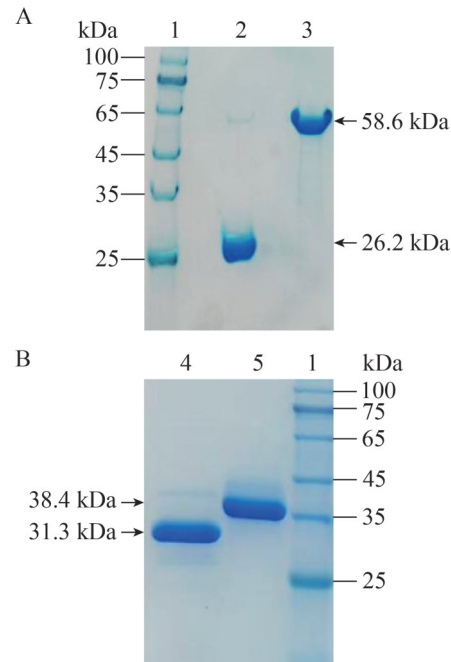


图3 关键酶的纯化及SDS-PAGE分析
Figure 3 SDS-PAGE analysis of the purified key enzymes. A, B: SDS-PAGE analysis of the purified BFD-M6, FSA^{A129S}, NsTDH, and BsMDH. Lane 1: Protein marker; Lane 2: Purified FSA^{A129S}; Lane 3: Purified BFD-M6; Lane 4: Purified NsTDH; Lane 5: Purified BsMDH.

表 2 BFD-M6、FSA^{A129S}、NsTDH 和 BsMDH 的酶活

Table 2 Specific activity of BFD-M6, FSA^{A129S}, NsTDH, and BsMDH

Enzyme	Substrate concentration/ (mmol/L)	Specific activity/ (U/mg)
BFD-M6	1 500	0.49
FSA ^{A129S}	1 500	15.07
NsTDH	375	6.73
BsMDH	375	0.28

为 10 mg/mL 时, L-赤藓酮糖的产量接近理论最大值 375 mmol/L, 产率>99.9%, 此时反应 5 h 与 10 h 的产量无明显差异, 表明 5 h 足以完成该步反应。进一步分析可知, 当 BFD-M6 用量低于 10 mg/mL 时, 甲醛无法完全转化为 L-赤藓

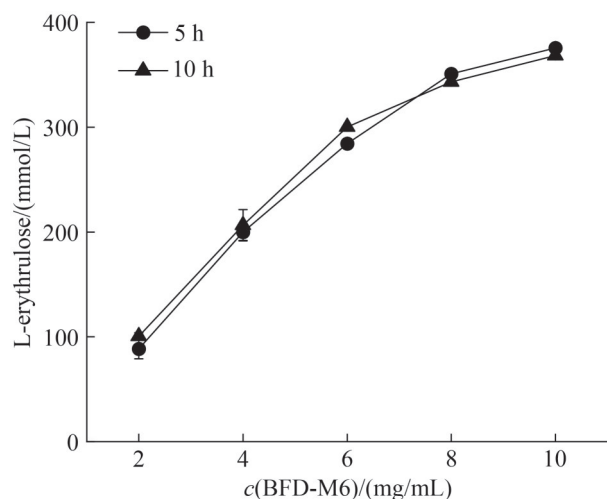


图4 BFD-M6浓度对L-赤藓酮糖产量的影响

Figure 4 Effect of BFD-M6 concentration on L-erythrulose production. Reaction conditions: 300 μ L 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 1 500 mmol/L substrate, 1 mmol/L TPP, at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h and 10 h.

酮糖, 且延长反应时间无法弥补 BFD-M6 酶量不足导致的转化限制。因此, 提高 BFD-M6 酶用量是实现甲醛完全转化为 L-赤藓酮糖的关键因素。

在确定 BFD-M6 最佳酶量为 10 mg/mL 后, 为优化 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 的添加量, 设置其浓度梯度为 0.25、0.5、1、2、4、6、8 mg/mL 进行反应。反应 5 h 后, 测定 L-赤藓酮糖的生成量, 结果如图 5 所示。 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 蛋白浓度为 1 mg/mL 时, L-赤藓酮糖的产量最高, 为 307.23 mmol/L, 转化率 81.9%。该转化率未达 100%, 可能与反应中使用了冻干酶粉而非新鲜酶液有关。

2.3.2 L-赤藓酮糖还原为 L-苏糖醇的酶量优化

第二阶段反应以 L-赤藓酮糖为底物, 经 L-苏糖醇脱氢酶 NsTDH 催化生成终产物 L-苏糖醇, 同时引入 BsMDH 构建辅酶再生系统, 以维持反应的持续进行。首先考察了不同浓度的 NsTDH (0.25、0.5、1、3、5 mg/mL) 在底物 L-赤

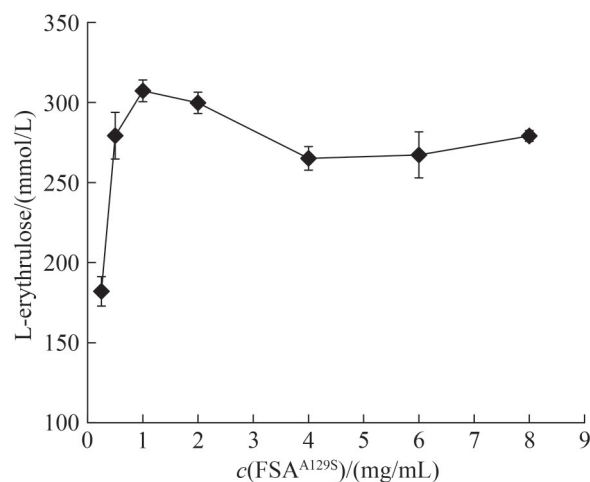


图5 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 浓度对L-赤藓酮糖产量的影响

Figure 5 Effect of $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ concentration on L-erythrulose production. Reaction conditions: 300 μ L 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 1 500 mmol/L substrate, 1 mmol/L TPP, at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 5 h.

藓酮糖初始浓度为 375 mmol/L、 BsMDH 纯酶添加量为 5 mg/mL 的条件下, 分别于反应 5 h 和 10 h 后体系中 L-苏糖醇的生成量。如图 6 所示, 反应 5 h 时, NsTDH 蛋白浓度为 1 mg/mL 条件下 L-苏糖醇产量达最高值 200.1 mmol/L, 产率为 54.8%; 延长反应时间至 10 h, 仅需 0.5 mg/mL 的 NsTDH 即可实现最大产量。上述结果表明, NsTDH 具有较高的催化活性及反应稳定性。在较低酶用量条件下, 适当延长反应时间也可实现较高的底物转化率。综合考量反应速率与效率, 最终确定 1 mg/mL 为 NsTDH 的工作浓度, 以实现在较短反应时间内获得最大转化效果的目标。

在确定 NsTDH 浓度为 1 mg/mL 的基础上, 为进一步优化 BsMDH 蛋白的添加量, 分别选取 1、3、5、8 mg/mL 4 个浓度梯度进行反应。反应 2 h 后, 测定 L-苏糖醇的生成量, 结果如图 7 所示。当 BsMDH 蛋白浓度为 8 mg/mL 时 L-苏糖醇产量最高, 达 194.67 mmol/L, 对应转化率为 51.9%。由于 BsMDH 在更高浓度下会出现沉

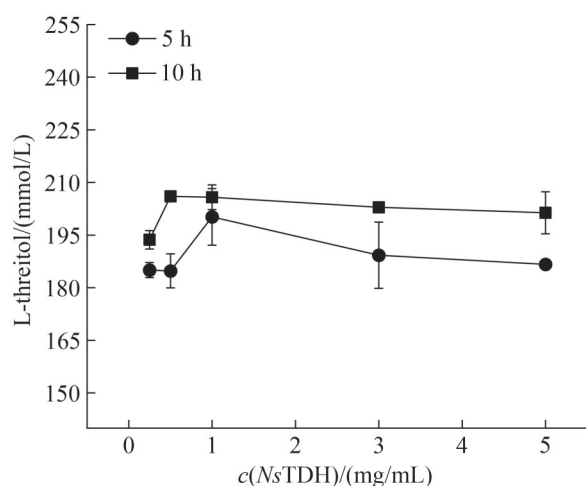


图6 *NsTDH*浓度对L-苏糖醇产量的影响

Figure 6 Effect of *NsTDH* concentration on L-threitol production. Reaction conditions: 300 μ L 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L $MgSO_4$), 375 mmol/L substrate, 2 mmol/L NAD^+ , at 30 $^{\circ}C$ for 5 h and 10 h.

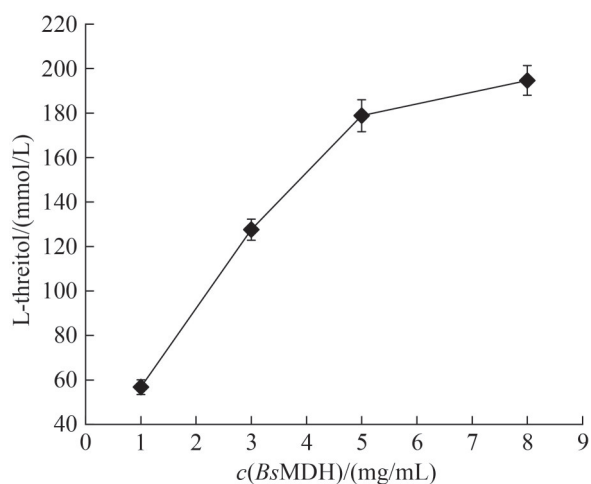


图7 *BsMDH*浓度对L-苏糖醇产量的影响

Figure 7 Effect of *BsMDH* concentration on L-threitol production. Reaction conditions: 300 μ L 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L $MgSO_4$), 375 mmol/L substrate, 2 mmol/L NAD^+ , at 30 $^{\circ}C$ for 2 h and 12 h.

淀现象, 因此未尝试使用浓度超过 8 mg/mL 的 *BsMDH* 进行催化反应。进一步将反应时间延长至 12 h, 在添加 8 mg/mL *BsMDH* 的条件下 L-苏

糖醇产量为 209 mmol/L, 与 2 h 的产量相比增幅有限, 表明产物的生成主要集中在反应初期的 2 h 内。基于上述结果, 后续将第二阶段反应时间控制在 2-10 h 之间进行优化。

2.4 辅酶再生循环体系的优化

在第二阶段反应中, L-苏糖醇产率基本维持在 50% 左右, 推测是异丙醇浓度过高对酶活性产生了抑制作用。为此, 将 L-赤藓酮糖和共底物异丙醇的浓度调整为第一阶段产物浓度的 50%, 即 187.5 mmol/L。同时, 为进一步探究添加不同氧化还原状态的辅因子(NAD^+ 和 $NADH$)对 L-苏糖醇产量的影响, 本研究在反应体系中加入 1 mg/mL *NsTDH* 与 8 mg/mL *BsMDH* 的同时分别考察了添加 2 mmol/L $NADH$ 或 NAD^+ 时对 L-苏糖醇产量的影响。如图 8 所示, 在添加 2 种不同形态辅酶的反应体系中, L-苏糖醇的产量均未随反应时间延长而显著提升, 表明反应在 3 h 时已基本达到平衡, 因此最终确定 3 h 为

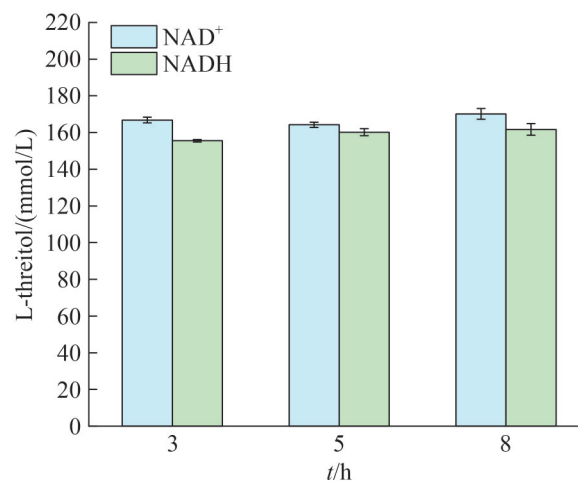


图8 初始辅酶形式(NAD^+ 和 $NADH$)对L-苏糖醇产量的影响

Figure 8 Effect of initial cofactor forms (NAD^+ and $NADH$) on L-threitol production. Reaction conditions: 1.5 mL 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L $MgSO_4$), 187.5 mmol/L isopropanol, 2 mmol/L NAD^+ or 2 mmol/L $NADH$, at 30 $^{\circ}C$ for 3, 5 and 8 h.

最优反应时间。进一步观察发现,添加 NAD^+ 的体系中 L-苏糖醇的生成量始终高于添加 NADH 的体系,说明在该步反应中氧化型辅因子 NAD^+ 更有利于驱动反应向产物方向进行。此外,降低 L-赤藓酮糖和共底物异丙醇浓度后,产物 L-苏糖醇的产量在 3 h 即可达到 166.76 mmol/L,相应产率从 50% 提升至 89%,说明降低底物浓度有效解除了异丙醇对 *BsMDH* 的抑制作用,同时 NAD^+ 作为初始辅因子更有利于维持辅酶再生循环的高效运转,从而显著提升了还原反应的动力学和热力学驱动力。

2.5 优化条件下由甲醛合成 L-苏糖醇

根据 2.3.1 节中 BFD-M6 和 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 酶用量的优化结果,反应体系初始组成包含: 甲醛 (1 500 mmol/L)、BFD-M6 (10 mg/mL) 和 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ (1 mg/mL)。分别在反应 3 h 和 5 h 时检测中间产物 L-赤藓酮糖的产量,结果分别为 270 mmol/L 和 375 mmol/L (图 9A)。由此确定第一阶段反应

时长为 5 h,底物可基本完全转化为目标产物。随后,在 5 h 反应液中加入 1 mg/mL *NsTDH* 和 8 mg/mL *BsMDH*,进行第二阶段反应。实验中设置 NAD^+ 浓度为 2 mmol/L 和 3 mmol/L,以探究增加辅酶浓度是否能够获得更高的 L-苏糖醇生成量。如图 9B 所示,提高 NAD^+ 初始浓度并未提升 L-苏糖醇的生成量,反应 3 h 后, L-苏糖醇产量为 155.15 mmol/L,对应产率为 84.1%。

至此,已完成甲醛一锅两步酶法转化为 L-苏糖醇的整体反应过程优化。确定第一阶段反应中 BFD-M6 和 $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ 添加量分别为 10 mg/mL 和 1 mg/mL,于 30 °C 反应 5 h 即可实现底物甲醛的完全转化(转化率>99.9%);第二阶段反应中 *NsTDH* 和 *BsMDH* 的添加量分别为 1 mg/mL 和 8 mg/mL,同样于 30 °C 反应,终产物 L-苏糖醇的产率仅需 3 h 即可达到 89%。经分析发现, L-苏糖醇的总产率主要受限于第二阶段反应,即 L-赤藓酮糖向 L-苏糖醇的转化阶段。在反应体

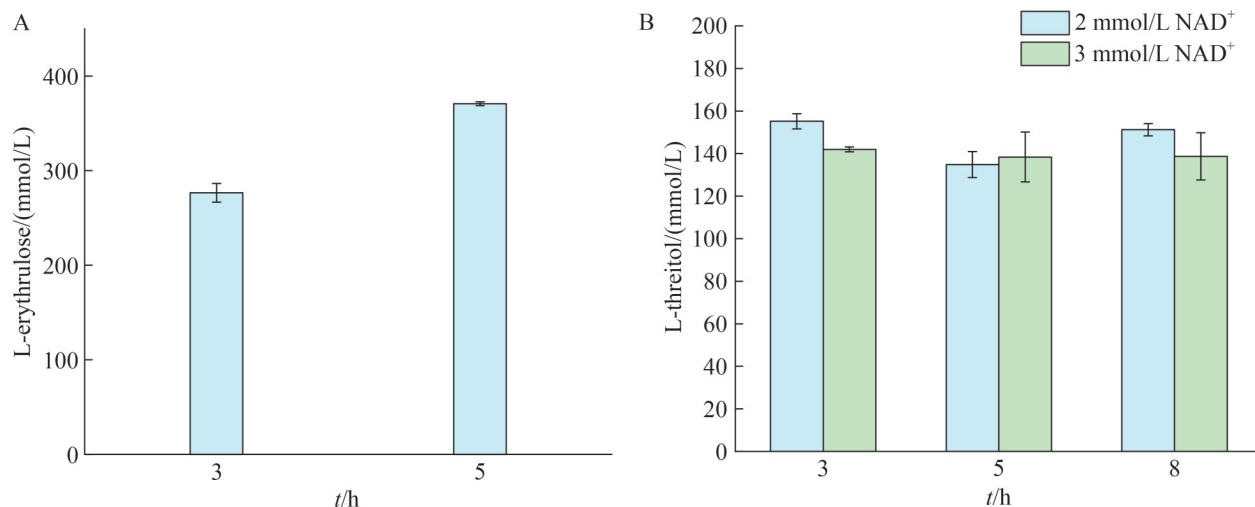


图9 反应时间与辅酶浓度对L-赤藓酮糖(A)和L-苏糖醇(B)产量的影响

Figure 9 Effects of reaction time and coenzyme concentration on L-erythrulose (A) and L-threitol (B) production. In A, Reaction conditions: 1.5 mL 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 1 500 mmol/L substrate, 1 mmol/L TPP, at 30 °C for 3 h and 5 h. In B, Reaction conditions: 750 μL 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 375 μL of the reaction mixture from the BFD-M6 and $\text{FSA}^{\text{A129S}}$ coupling step was transferred to serve as the substrate, 2 or 3 mmol/L NAD^+ , 187.5 mmol/L isopropanol, at 30 °C for 3, 5, and 8 h.

系中, L-赤藓酮糖的残余量低于 10 mmol/L, 且液相色谱未检测到明显的副产物峰。为进一步提高 L-赤藓酮糖向目标产物的转化率, 本研究重点对第二阶段反应温度进行了优化。如图 10 所示, 在 30–45 °C 的温度范围内, L-苏糖醇的产率维持在约 88%, 未随温度升高而显著增加。上述结果表明, 在当前反应体系下, L-赤藓酮糖的转化已接近其热力学或动力学极限, 进一步提高转化率需从催化剂活性或反应器设计等其他方面入手。考虑到降低能量消耗、维持温和反应条件, 本研究最终选择 30 °C 作为第二阶段酶级联反应的工作温度。

2.6 甲醛合成 L-苏糖醇的体系放大

为进一步评估从甲醛合成 L-苏糖醇的放大可行性, 基于上述优化条件, 将第一阶段转化甲醛为 L-赤藓酮糖的反应体系扩大至 20 mL, 第二阶段从 L-赤藓酮糖合成 L-苏糖醇的反应体

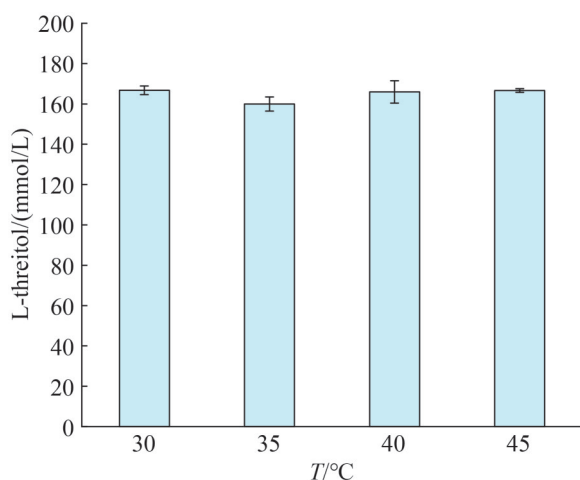


图10 L-赤藓酮糖生成L-苏糖醇的反应温度优化

Figure 10 Reaction temperature optimization for L-threitol production from L-erythrulose. Reaction conditions: 750 μ L 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 375 μ L of the reaction mixture from the BFD-M6 and FSA^{A129S} coupling step was transferred to serve as the substrate, 2 mmol/L NAD^+ , 187.5 mmol/L isopropanol, at 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C for 3 h.

系扩大至 36 mL。如图 11 所示, 第一阶段 L-赤藓酮糖产量为 366.1 mmol/L, 产率高达 97.6%; 第二阶段反应得到 L-苏糖醇 150.1 mmol/L, 产率为 80.1%。上述结果表明, 该催化体系表现出良好的放大可行性, 产物浓度较高, 证实该策略具有制备级合成的应用潜力。

3 讨论与结论

L-苏糖醇作为一种高价值的药物合成中间体, 开发高效、绿色的生物合成路线具有重要意义。以一碳化合物甲醛为原料合成 L-苏糖醇具有原子经济性高、反应条件温和、绿色可持续等显著优势。本研究以甲醛为唯一碳源, 针对一锅两步法反应体系, 通过系统优化关键酶

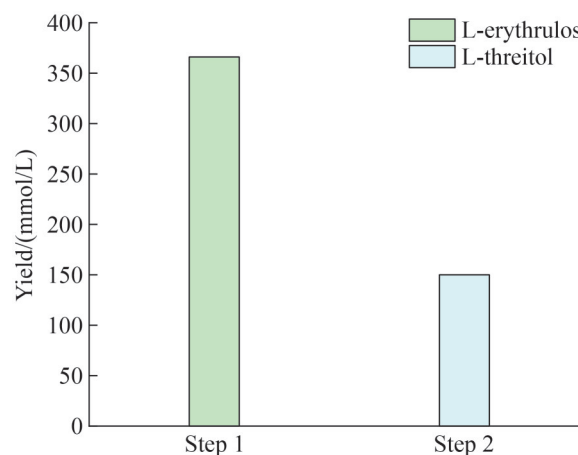


图11 放大体系中甲醛合成L-苏糖醇的级联反应

Figure 11 Scale-up of the cascade reaction for L-threitol synthesis from formaldehyde. Step 1: From formaldehyde to L-erythrulose. Reaction conditions: 20 mL 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4), 10 mg/mL BFD-M6, 1 mg/mL FSA^{A129S}, 1 500 mmol/L formaldehyde, 1 mmol/L TPP, at 30 °C for 5 h. Step 2: From L-erythrulose to L-threitol. Reaction conditions: 36 mL 50 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4, 5 mmol/L MgSO_4), 18 mL step 1 reaction mixture, 8 mg/mL *Bs*MDH, 1 mg/mL *Ns*TDH, 187.5 mmol/L isopropanol, 2 mmol/L NAD^+ , at 30 °C for 3 h.

适配性、辅因子初始氧化还原态, 以及浓度、反应温度与时间等核心参数, 并基于各酶比活力差异精准调控各关键酶的添加量, 可在维持高转化率的同时显著降低单位产物所需的酶负载量(g 酶/g 产物), 有效降低了酶制剂成本。优化结果显示, FSA^{A129S} 和 *NsTDH* 的酶活力显著高于 BFD-M6 和 *BsMDH*, 其用量分别降低了 87% 和 67%, 验证了基于酶活精准适配优化策略的有效性, 获得较高产量的 L-苏糖醇。然而, 该反应液若直接用于后续药物合成须经进一步纯化处理(如活性炭吸附或重结晶去除残留甲醛), 以确保产物纯度符合要求。此外, 在探究 *BsMDH*/异丙醇辅酶再生循环体系中辅酶初始氧化还原态对 L-苏糖醇产量的影响时发现, 体系对 NAD⁺ 表现出明显的偏好性, 以氧化态 NAD⁺ 作为起始辅因子较还原态 NADH 显著提升了多酶体系的转化效率。然而, 本研究也发现部分酶存在制约工业化应用的固有瓶颈: *NsTDH* 虽活性较高, 但可溶性表达欠佳; *BsMDH* 在低温贮存条件下易沉淀失活, 稳定性不足。针对上述问题, 未来研究可从以下方向展开。(1) 改善 *NsTDH* 的可溶性表达。可尝试通过融合促溶标签^[23] (如 MBP、SUMO、GST 等) 提高 *NsTDH* 在大肠杆菌中的可溶性表达水平; 结合分子伴侣共表达或低温诱导表达策略^[24] 减少包涵体的形成。利用理性设计或定向进化对 *NsTDH* 表面疏水区域或折叠关键残基进行改造, 也有望提升其可溶性和折叠效率。(2) 提升 *BsMDH* 的贮存稳定性。针对 *BsMDH* 低温下易沉淀失活的问题, 可开展结构指导的定点突变, 引入分子内二硫键或优化表面电荷分布以增强其构象稳定性^[25-26]; 同时, 筛选合适的保护剂配方(如海藻糖、甘油、多元醇等), 或在冻干过程中添加辅酶/底物类似物以维持其活性构象。此外, 探索固定化酶技术(如共价结合或包埋)也可有效提高其在贮存和使用过程中的稳定性。基于此, 后续研究将结合蛋白质工程改造与制剂工艺优化, 系统解决上述酶的产业化瓶颈, 推动该级联反

应体系的工业化应用。

综上所述, 本研究成功构建了一个高效、稳定且可重复的多酶级联反应体系。该体系以甲醛为起始底物, 通过一锅两步法合成药物中间体 L-苏糖醇, 该合成路线的系统优化目前鲜见报道, 其工艺参数的探索本身具有鲜明的新颖性。在优化策略上, 本研究突破传统单因素或单酶优化的局限, 提出了“多酶体系适配性”的全局优化理念, 通过系统考察酶与酶之间的浓度配比及辅酶再生平衡, 显著提升了多酶级联反应的协同效率。在此策略指导下, 关键酶 FSA^{A129S} 和 *NsTDH* 的用量较优化前分别降低了 87% 和 67%, 小体系产率保持近 90%, 放大体系产率从 43% 提升至 80%, 且反应时间大幅缩短 60%, 在实现“降本”的同时取得了显著的“增效”效果。本研究结果为 L-苏糖醇的酶法工业化生产提供了重要的理论与技术基础。

作者贡献声明

张如珂: 实验及文章撰写; 谭子城: 数据分析及文章修改; 魏金霞: 文章修改; 朱蕾蕾: 整体实验设计指导及文章修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Li Q, Xu S, Li T, Ji LY, Cheng HR. Threitol, a novel functional sugar alcohol biosynthesized by engineered *Yarrowia lipolytica*, has the potential as a low-calorie sugar-reducing sweetener[J]. *Foods*, 2025, 14(14): 2539.
- [2] Regnat K, Mach RL, Mach-Aigner AR. Erythritol as sweetener: wherefrom and whereto?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 587-595.
- [3] Feit PW. Verfahren zur herstellung der stereoisomeren und des racemats von butan-1,2,3,4-tetrol-1,4-di-(methansulfonat): DE1188583B[P]. 1965-03-11.
- [4] Chekerov R, Kaltenecker G, Reichert D, Göhler T, Klare P, Oskay-Özcelik G, Sauer U, Wischnik A, Vehling-Kaiser U, Becker M, Hutzschenreuter U, Ammon A, Heidrich-Lorsbach E, Schouli J. Treosulfan in the treatment of advanced ovarian cancer - results of a German multicenter non-interventional study[J].

- Anticancer Research, 2015, 35(12): 6869-6875.
- [5] Frietsch JJ, Miethke J, Linke P, Crodel CC, Schnetzke U, Scholl S, Hochhaus A, Hilgendorf I. Treosulfan plus fludarabine versus TEAM as conditioning treatment before autologous stem cell transplantation for B-cell non-Hodgkin lymphoma[J]. Bone Marrow Transplantation, 2022, 57(7): 1164-1170.
- [6] Schmitt A, Schmidt-Hieber M, Martus P, Bechrakis NE, Schuster R, Siehl JM, Foerster MH, Thiel E, Keilholz U. A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma[J]. Annals of Oncology, 2006, 17(12): 1826-1829.
- [7] Wiendl H, Kieseier BC, Weissert R, Mylius HA, Pichlmeier U, Hartung HP, Melms A, Kuker W, Weller M. Treatment of active secondary progressive multiple sclerosis with treosulfan[J]. Journal of Neurology, 2007, 254(7): 884-889.
- [8] Beck AK, Gysi P, la Vecchia L, Seebach D. (4R,5R)-2,2-dimethyl- α,α',α' -tetra(naphth-2-yl)-1,3-dioxolane-4,5-dimethanol from dimethyl tartrate and 2-naphthylmagnesium bromide[J]. Organic Syntheses, 1999, 76: 12-22.
- [9] Meier B, Kollroser M, Presser A. An optimized synthetic route for the preparation of the versatile chiral building block 1,4-di-*O*-benzylthreitol[J]. Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly, 2014, 145(2): 305-309.
- [10] Gras JL, Pellissier H, Nouguié R. Synthesis of new chiral auxiliaries derived from L-threitol[J]. The Journal of Organic Chemistry, 1989, 54(24): 5675-5677.
- [11] Kaur R, Chen JL, Dawoodji A, Cerundolo V, Garcia-Diaz YR, Wojno J, Cox LR, Besra GS, Moghaddam B, Perrie Y. Preparation, characterisation and entrapment of a non-glycosidic threitol ceramide into liposomes for presentation to invariant natural killer T cells[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100(7): 2724-2733.
- [12] Garcia Diaz YR, Wojno J, Cox LR, Besra GS. Synthesis of threitol ceramide and [^{14}C] threitol ceramide, non-glycosidic analogues of the potent CD1d antigen α -galactosyl ceramide[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2009, 20(6/7/8): 747-753.
- [13] Silk JD, Salio M, Reddy BG, Shepherd D, Gileadi U, Brown J, Masri SH, Polzella P, Ritter G, Jones EY, Schmidt RR, Cerundolo V. Cutting edge: nonglycosidic CD1d lipid ligands activate human and murine invariant NKT cells[J]. The Journal of Immunology, 2008, 180(10): 6452-6456.
- [14] Feit PW. 1,4-bismethanesulfonates of the stereoisomeric butanetetraols and related compounds[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 1964, 7(1): 14-17.
- [15] Rubin LJ, Lardy HA, Fischer HOL. Synthesis of the optically active enantiomorphous 2,3-butanediols[J]. Journal of the American Chemical Society, 1952, 74(2): 425-428.
- [16] Park CY, Kim BM, Sharpless KB. Catalytic osmylation of conjugated dienes: a one-pot stereoselective synthesis of polyols[J]. Tetrahedron Letters, 1991, 32(8): 1003-1006.
- [17] Wu SB, Wang JZ, Wang JW. Research on industrial synthesis of butadiene rubber[J]. China Resources Comprehensive Utilization, 2024, 42(8): 14-18.
- [18] Friedova N, Pelclova D, Obertova N, Lach K, Kesslerova K, Kohout P. Osmium absorption after osmium tetroxide skin and eye exposure[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2020, 127(5): 429-433.
- [19] Gong S, Li TZ, Tang ZJ, Tan ZJ, Zhang RK, Olsen K, Liu HF, Zhu LL. One-pot enzymatic synthesis of l-threitol from C1 formaldehyde[J]. Green Chemistry, 2025, 27(8): 2189-2196.
- [20] Li TZ, Tang ZJ, Wei HL, Tan ZJ, Liu P, Li JL, Zheng YY, Lin JP, Liu WD, Jiang HF, Liu HF, Zhu LL, Ma YH. Totally atom-economical synthesis of lactic acid from formaldehyde: combined bio-carboligation and chemorearrangement without the isolation of intermediates[J]. Green Chemistry, 2020, 22(20): 6809-6814.
- [21] Castillo J, Guérard-Hélaine C, Gutiérrez M, Garrabou X, Sancelme M, Schürmann M, Inoue T, Hélaine V, Charmantray F, Gefflaut T, Hecquet L, Joglar J, Clapés P, Sprenger G, Lemaire M. A mutant D-fructose-6-phosphate aldolase (Ala129Ser) with improved affinity towards dihydroxyacetone for the synthesis of polyhydroxylated compounds[J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2010, 352(6): 1039-1046.
- [22] Whitaker WB, Jones JA, Bennett RK, Gonzalez JE, Vernacchio VR, Collins SM, Palmer MA, Schmidt S, Antoniewicz MR, Koffas MA, Papoutsakis ET. Engineering the biological conversion of methanol to specialty chemicals in *Escherichia coli*[J]. Metabolic Engineering, 2017, 39: 49-59.
- [23] Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(4): 353-358.
- [24] Estabragh AM, Sadeghi HMM, Akbari V. Co-expression of chaperones for improvement of soluble expression and purification of an anti-HER2 scFv in *Escherichia coli*[J]. Advanced Biomedical Research, 2022, 11(1): 117.
- [25] Banach M, Kalinowska B, Konieczny L, Roterman I. Role of disulfide bonds in stabilizing the conformation of selected enzymes: an approach based on divergence entropy applied to the structure of hydrophobic core in proteins[J]. Entropy, 2016, 18(3): 67.
- [26] Gribenko AV, Patel MM, Liu JJ, McCallum SA, Wang CY, Makhatazde GI. Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(8): 2601-2606.