

· 合成生物技术 ·

## 生物催化甲醛生成 L-木糖

初斋林<sup>1,2</sup>, 逯晓云<sup>2</sup>, 刘玉万<sup>2</sup>, 崔博<sup>2</sup>, 靖美东<sup>1</sup>, 江会锋<sup>2</sup>

1 鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025

2 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

初斋林, 逯晓云, 刘玉万, 等. 生物催化甲醛生成 L-木糖. 生物工程学报, 2020, 36(5): 942-948.

Chu ZL, Lu XY, Liu YW, et al. Biocatalysis of formaldehyde to L-xylose. Chin J Biotech, 2020, 36(5): 942-948.

**摘要:** 在当今不可再生资源日益消耗的情形下, 利用生物合成的技术, 将甲醛转变成糖类, 具有重要意义。该过程最重要的是找到一个合适的催化剂组合来实现甲醛的二聚反应。在最近的研究中, 报道发现了一种乙醇醛合酶 (Glycolaldehyde synthase, GALS) 可以催化这一反应, 将其与 D-果糖-6 磷酸醛缩酶 (D-fructose-6-phosphate aldolase, FSA) 组合使用, 即“一锅酶”法, 可以利用甲醛合成 L-木糖, 并且转化率可达 64%。这一过程的实现也为合成其他糖的反应提供了参考。

**关键词:** 甲醛, 乙醇醛, L-木糖, 生物合成, 甲醛聚糖反应

## Biocatalysis of formaldehyde to L-xylose

Zhailin Chu<sup>1,2</sup>, Xiaoyun Lu<sup>2</sup>, Yuwan Liu<sup>2</sup>, Bo Cui<sup>2</sup>, Meidong Jing<sup>1</sup>, and Huifeng Jiang<sup>2</sup>

1 College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, Shandong, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** It is of great significance to use biosynthesis to transform the inorganic substance formaldehyde into organic sugars. Most important in this process was to find a suitable catalyst combination to achieve the dimerization of formaldehyde. In a recent report, an engineered glycolaldehyde synthase was reported to catalyze this reaction. It could be combined with engineered D-fructose-6-phosphate aldolase, a “one-pot enzyme” method, to synthesize L-xylose using formaldehyde and the conversion rate could reach up to 64%. This process also provides a reference for the synthesis of other sugars. With the increasing consumption of non-renewable resources, it was of great significance to convert formaldehyde into sugar by biosynthesis.

**Keywords:** formaldehyde, glycolaldehyde, L-xylose, biosynthesis, formaldehyde reaction

**Received:** December 12, 2019; **Accepted:** February 24, 2020

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31922047, 31901015).

**Corresponding author:** Huifeng Jiang. Tel/Fax: +86-22-24828732; E-mail: jiang\_hf@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31922047, 31901015) 资助。

网络出版时间: 2020-03-11

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200310.1124.002.html>

利用甲醇、甲醛等简单的一碳物质合成复杂的糖类已经有 150 多年的历史,该过程不仅与生命起源前地球上最初的碳水化合物形成有关<sup>[1]</sup>,还是一种比较理想的生物单糖合成方法<sup>[2]</sup>。甲醛聚糖(Formose)反应通常由水溶液中的无机碱(氢氧化钙等)充当催化剂,随后激活其他复杂的反应,如羟醛反应、反醇醛缩合反应、坎尼扎罗反应、交叉坎尼扎罗反应等。由于甲醛聚糖反应过程极其复杂,会产生数十个直链和支链单糖<sup>[3]</sup>以及多元醇<sup>[4]</sup>和聚羟基碳酸<sup>[5]</sup>,产物分离提纯难度大,限制了其商业化要求的经济价值,基于此,本研究设计并优化了一条利用生物催化将甲醛转变成 L-木糖的途径。

据报道,乙醇醛是甲醛聚糖反应中非常重要的中间产物,它通常来源于羟醛缩合和逆羟醛缩合的催化反应<sup>[6]</sup>。在自然界中,甲醛被紫外线辐射催化后也可生成乙醇醛<sup>[7-11]</sup>,但是在紫外线的作用下,糖类会被破坏,最终在光化学反应中获得单糖的收率并不高。此外,噻唑盐也是一种合适的催化剂,可催化甲醛的低聚反应,生成二羟基丙酮(DHA)<sup>[12-17]</sup>。David Baker 探索了这类酶,并筛选改造苯甲醛裂解酶(Benzaldehyde lyase, BAL)获得比野生型活性提高 100 倍的突变体甲醛酶(Formolase, FLS),使其具有合成乙醇醛和二羟基丙酮的功能,但是 FLS 主要合成产物为二羟基丙酮<sup>[18-19]</sup>。因此,寻找一种新的生物催化剂来实现这一反应具有重要意义。

最近,本实验室发现并改造获得乙醇醛合酶(GALS)<sup>[20]</sup>,它可以高效地催化甲醛生成乙醇醛。本研究将寻找一个合适的组合,使一碳物质经该组合催化合成糖类<sup>[21-24]</sup>。通过结合甲醛聚糖反应与醛缩反应,提出了一种从甲醛合成 L-木糖的新途径,即利用 GALS 与 FSA 的组合来催化甲醛合成 L-木糖。这些酶分别在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中过表达,然后通过“一锅酶”法以甲醛为底物合成 L-木糖。结果显示,合成 L-木糖的

酶促反应有较高的转化率,而且研究结果也给利用甲醛合成其他糖类提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验试剂

甲醛、乙醇醛、L-甘油醛、L-木糖和异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Sigma 公司,酵母粉和胰化蛋白胨购自英国 Oxoid 公司,乙腈和三氟乙酸购自德国 Merck 公司,硫酸卡那霉素、氨苄青霉素、甘油、吡啶、咪唑、磷酸二氢钾和磷酸氢二钾等购自北京索莱宝科技有限公司,所有限制性内切酶和 DNA 连接酶均购自 Novagen 公司, Ni-NTA 亲和色谱柱购自 Qiagen。

本研究所使用的所有菌株和质粒均在本实验室保存。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  用于质粒构建, BL21(DE3) 用于酶的表达。pET-28a(+) 用于表达 GALS, pET-22b(+) 用于表达 FSA。

#### 1.1.2 实验配方

蛋白缓冲液 A: 50 mmol/L  $K_3PO_4$ , 5 mmol/L  $MgSO_4$ , pH 7.4; 蛋白缓冲液 B: 50 mmol/L  $K_3PO_4$ , 5 mmol/L  $MgSO_4$ , 1 mol/L 咪唑, pH 7.4; 蛋白缓冲液 C: 50 mmol/L 三乙醇胺, pH 7.5; 蛋白缓冲液 D: 50 mmol/L 三乙醇胺, 1 mol/L 咪唑, pH 7.5; 洗脱液: 含不同浓度的咪唑缓冲液; 稀有糖衍生试剂(1 mL 体系): 21.1 mg 苄氧基胺盐酸盐, 300  $\mu$ L 甲醇, 660  $\mu$ L 吡啶, 40  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。LB 培养基: 酵母粉 5 g/L, 胰化蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L; LB 固体平板: 酵母粉 5 g/L, 胰化蛋白胨 10 g/L, NaCl 10 g/L, 1.5% (W/V) 琼脂; 2YT 培养基: 酵母粉 10 g/L, 胰化蛋白胨 16 g/L, NaCl 5 g/L。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 质粒构建与克隆

将密码子优化过的 GALS 克隆到 pET28a(+) *Nde* I 和 *Xho* I 之间, 构建质粒 GALS-pET-28a,

并将突变体 FSA-A129T/A165G 克隆到 pET-22b(+) 的 *Sal* I 和 *Xho* I 之间, 构建质粒 FSA-A129T/A165G-pET-22b, 然后将含有 GALS 或 FSA 基因的质粒分别转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 在含有对应抗生素的 LB 平板上培养过夜, 随后挑取单克隆测序验证, 序列正确的质粒保存于 -20 °C 备用。硫酸卡那霉素和氨苄青霉素的工作浓度均为 100  $\mu$ g/mL。

### 1.2.2 GALS 和 FSA 的表达与纯化

将 GALS-pET-28a、FSA-A129T/A165G-pET-22b 质粒分别转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 涂布在含相应抗生素的 LB 固体平板上过夜。挑取单克隆于 5 mL 液体 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 过夜培养作为种子液。第二天将种子液接种到 800 mL 2YT 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至  $OD_{600}$  约 0.6, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 16 °C、220 r/min 诱导表达 16 h。随后于 5 500 r/min 离心收集菌体, 用蛋白缓冲液 A 重悬并离心清洗菌体, 于 -20 °C 保存备用。

重悬菌体利用高压细胞破碎仪 (JN-3000plus) 破碎, 120 MPa, 2 次。12 000 r/min、4 °C 离心 40 min 去除细胞碎片。将上层清液取出待用, 采用镍离子亲和层析柱方法纯化目的蛋白, 上清液过两遍镍柱, 然后 GALS (FSA) 分别用含 50 mmol/L 咪唑的蛋白缓冲液 A (蛋白缓冲液 C) 清洗杂蛋白, 用含 200 mmol/L 咪唑的蛋白缓冲液 A (蛋白缓冲液 C) 洗目的蛋白, 收集洗脱液用 15 mL 30 kDa (3 kDa) 的超滤管在 4 °C、3 600 r/min 条件下离心浓缩, 再用蛋白缓冲液 A (蛋白缓冲液 C) 换液 2 次除去蛋白中的咪唑。

整个蛋白纯化过程, 从菌液破碎开始后续操作一直在 4 °C 条件下进行。

上述得到的纯化蛋白用 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) 试剂盒测蛋白浓度, 于 -80 °C 保存备用。

### 1.2.3 酶法催化甲醛合成木糖

反应体系 (200  $\mu$ L): 1 mg/mL GALS, 2 mg/mL FSA-A129T/A165G, 2 g/L 甲醛, 蛋白缓冲液 C 补足, 37 °C 反应 24 h。反应结束后, 取 10  $\mu$ L 样品进行稀有糖衍生。

稀有糖衍生方法 (200  $\mu$ L 体系): 取 10  $\mu$ L 的反应产物于 2 mL 的 EP 管中, 加入 50  $\mu$ L 稀有糖衍生试剂, 均匀混合, 50 °C 条件下反应 1 h, 再向 EP 管中加入 140  $\mu$ L 甲醇, 12 000 r/min 离心 30 min, 取 150  $\mu$ L 上清液进行 HPLC 检测。

### 1.2.4 目标产物木糖的检测

HPLC 检测条件: 安捷伦的液相检测系统 1260 Infinity II, 色谱柱为 XBridge C18, 5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm Column, 紫外检测器, 检测波长为 215 nm, 进样量 20  $\mu$ L, 流动相 A 为 0.1% TFA (V/V); B 为 0.095% TFA (V/V)-乙腈: 水 (4:1), 前 16 min B 相按 20%–60% 梯度增加, 对应的 A 相 80%–40% 递减, 后 14 min A 相维持 80%, B 相维持 20% 不变, 柱温 35 °C, 流速 1 mL/min, 共检测时间为 30 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲醛合成木糖通路的实现和木糖的检测

1861 年, Butlerow 首次报道了甲醛聚糖反应<sup>[25]</sup>, 之后的相关工作也一直在进行, 但是在提高产品选择性方面进展缓慢。主要原因是早期的研究工作以甲醛的水溶液为基本原料, 无机碱作催化剂, 终产物为由直链糖和支链糖组成的复杂混合物 (粘稠糖浆), 其产物的品种繁多 (通常 30 种以上)、结构类似 (同分异构体为主), 分离提纯难度大。20 世纪 80 年代以来, 以 T. Matsumoto 为代表的科学家们针对早期甲醛聚糖反应存在的问题, 进行了一系列技术上的重大改进。甲醛聚糖反应的研究方面取得了令人瞩目的新进展 (例如三碳糖的选择性已从早期的 10% 以下提高到接近 90%), 使甲醛聚糖技术具备了制备专一产品的

能力,并且在经济上显示了具有竞争能力的光明前景,但目前的研究仅限于低碳糖。

本研究设计了一条甲醛合成 L-木糖的新途径,整个路线是由两种酶来催化,即第一种是具有催化甲醛 (1) 合成乙醇醛 (2) 功能的酶 GALS,而第二种是能同时催化两步反应的酶 FSA,它能催化乙醇醛与甲醛生成 L-甘油醛 (3),同时又催化乙醇醛与 L-甘油醛,生成 L-木糖 (4) (图 1)。

采用高效液相色谱法检测 L-木糖,首先将反应产物进行衍生化处理并用甲醇稀释,处理后的样品离心取上清用 HPLC 检测,如图 2 所示,木糖标品和反应组均在 7.7 min 左右出峰,而对照组则没有检测到木糖的产生。由此证明,图 1 设计的途径可以成功实现并且可以检测到产物 L-木糖。

## 2.2 甲醛到 L-木糖途径的优化

对本实验室筛选改造的乙醇醛合酶 (GALS) 与 David Baker 教授探索改造的 FLS 进行比较,结果发现 GALS 可以专一性地催化甲醛生成乙醇醛,并且随着底物浓度的增加,虽然两种酶的催

化效率都在增加,但是 GALS 的催化效果更为明显,其催化效率约是 FLS 的 13 倍 (图 3),因此确定了图 1 设计的途径中第一步酶用 GALS。

为了进一步优化如图 1 所示的催化途径,设计了 3 组实验来验证反应的情况。图 4 中的设计是分别用野生型酶 GALS-WT 和筛选的酶 GALS-H281VQ282F 来催化底物甲醛,对照组中不添加任何酶。如图 3 所示,催化甲醛合成乙醇醛的过程得以实现,并且筛选得到的突变型酶的催化效率远远高于野生型,达到了 89.9%,而对照组无目标产物乙醇醛生成。而图 5 是用酶 FSA 分别催化乙醇醛、L-甘油醛和乙醇醛加 L-甘油醛 3 组不同底物生成 L-木糖的转化效率。由图 5 可知,当底物只有乙醇醛或 L-甘油醛存在时,FSA 无法催化其生成 L-木糖,而同时存在乙醇醛和 L-甘油醛时,FSA 才能催化二者生成 L-木糖,且催化效率达到 44.2%,由此证明了图 1 的途径示意图的 L-甘油醛 (3) 和乙醇醛生成 L-木糖 (4) 的步骤可以实现,并且有较高的催化效率。图 6

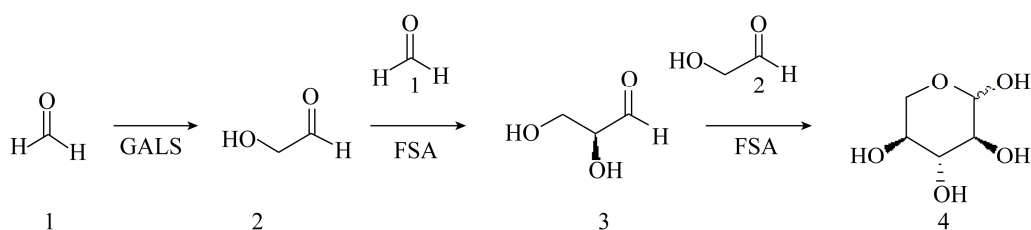


图 1 甲醛到 L-木糖催化途径示意图

Fig. 1 Schematic diagram of catalytic pathway from formaldehyde to L-xylose. GALS: glycolaldehyde synthase; FSA: D-fructose-6-phosphate aldolase.

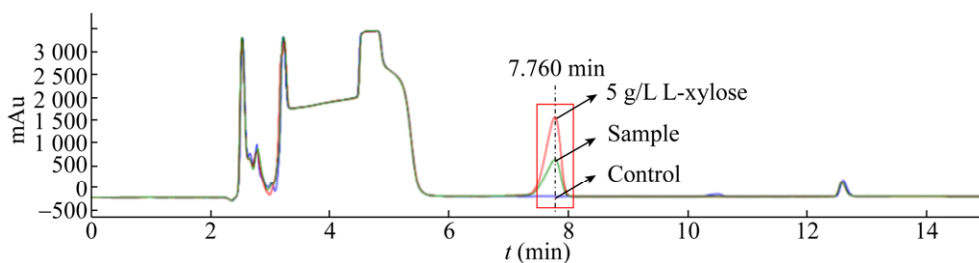


图 2 L-木糖液相检测

Fig. 2 Liquid phase detection of L-xylose.

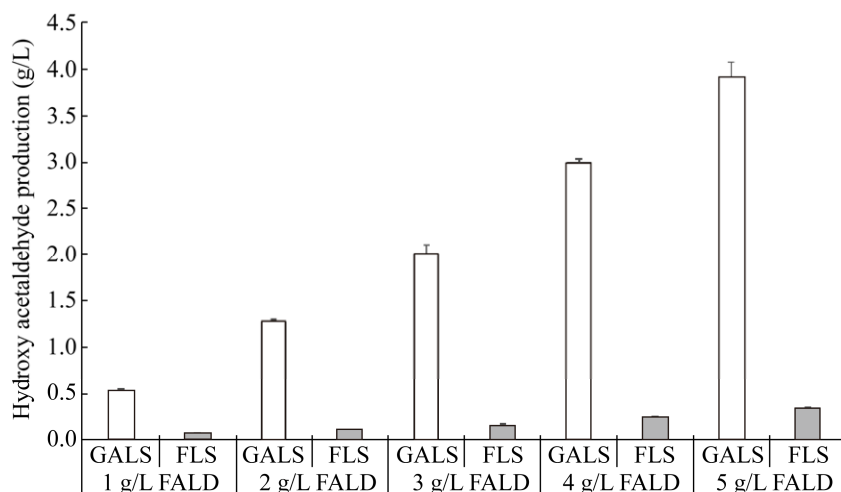


图3 不同底物浓度情况下两种酶 GALS 和 FLS 催化甲醛到羟基乙醛的产量

Fig. 3 Production of hydroxyacetaldehyde from formaldehyde using enzymes GALS and FLS at different substrate concentrations. GALS: glycolaldehyde synthase; FLS: formolase; FALD: formaldehyde.

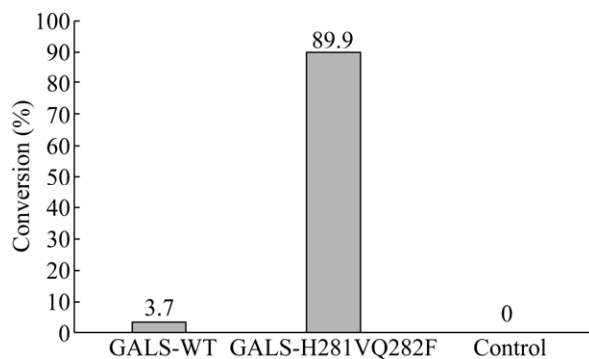


图4 野生型和突变型酶 GALS 催化甲醛生成乙醇醛的效率

Fig. 4 Efficiency of wild-type and mutant enzyme GALS in catalyzing formaldehyde to glycolaldehyde.

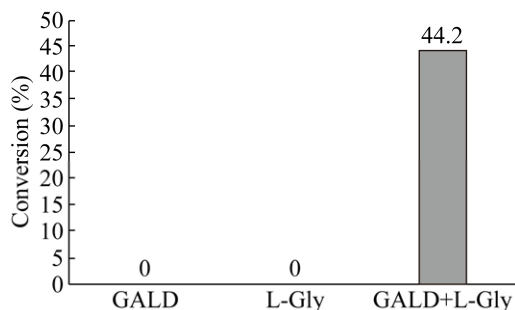


图5 酶 FSA 分别催化乙醇醛、L-甘油醛、乙醇醛和 L-甘油醛生成 L-木糖的转化率

Fig. 5 Enzyme FSA catalyzes the conversion rates of glycolaldehyde, L-glyceraldehyde, glycolaldehyde, and L-glyceraldehyde to L-xylose.

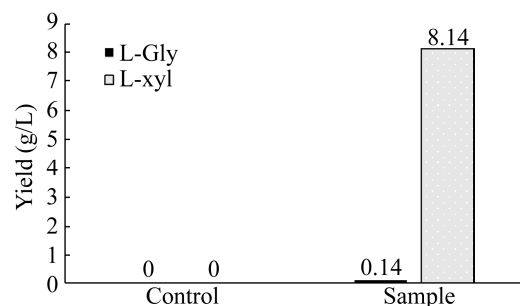


图6 FSA 催化甲醛和乙醇醛生成 L-甘油醛和 L-木糖的量

Fig. 6 Enzyme FSA catalyzes the production of l-glyceraldehyde and l-xylose from formaldehyde and glycolaldehyde. GALD: glycolaldehyde; L-Gly: L-glyceraldehyde; FSA: FSA<sup>A129TA165G</sup>; L-xyl: L-xylose.

是在底物甲醛和乙醇醛同时存在的情况下, FSA 催化二者生成 L-木糖的量, 以及中间产物 L-甘油醛的量。对照组无酶添加, 因此无 L-甘油醛和 L-木糖生成, 而 sample 组则检测到微量的 L-甘油醛和大量的 L-木糖, 因此可以说明图 1 的路径图中 FSA 催化乙醇醛 (2) 和甲醛生成 L-甘油醛 (3) 同时又催化 L-甘油醛 (3) 和乙醇醛生成 L-木糖 (4) 的过程可以实现。底物用的 0.1 mol/L FALD 和 0.2 mol/L GALD, 因此理论生成 0.1 mol/L L-木糖, 实际检测到 8.14 g, 因此该过程转化率为 54.3%, 而该过程相比图 5 中添加生成 L-木糖的

直接底物 L-甘油醛和乙醇醛的效率高, 原因可能是 L-甘油醛对 FSA 有一定抑制作用。

整个反应体系中, 甲醛不仅会被催化合成乙醇醛, 还会与乙醇醛反应生成 L-甘油醛, 乙醇醛可同时与甲醛和 L-甘油醛反应。因此, 使 GALS 和 FSA 的催化速率相匹配显得尤为重要。为了提高甲醛到 L-木糖的转化率, 测试比较了不同浓度、不同酶比例的 GALS 和 FSA。

为了获得更高的转化率, 对两种酶的比例进行优化, 发现适当的 FSA 对于该反应有促进作用。当甲醛的浓度为 1 g/L, 且使用比例为 1:1 的 GALS 与 FSA 时, 转化率高达 63.93%, 而整体来看, 当 GALS 与 FSA 的比例为 1:2 时, 整个体系催化效率比较稳定, 且在该比例下底物浓度对催化效率影响也较小, 因为甲醛参与两步, 一步自缩合成乙醇醛, 另一步还与乙醇醛反应生成 L-木糖, 所以如果 GALS 的比例过高会导致甲醛大部分都缩合为乙醇醛, 没有足够多的甲醛与乙醇醛反应生成 L-木糖, 因此该反应的关键是要保持一定优势的酶 FSA 的比例。整体从 3 组情况看, 底物浓度为 1 g/L 的甲醛, 足以维持整个反应 (图 7)。

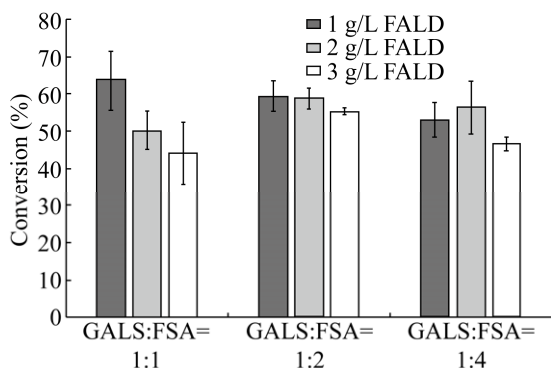


图 7 不同浓度甲醛为底物, 不同的 GALS 和 FSA 酶比例合成 L-木糖的转化率

Fig. 7 Different concentrations of formaldehyde as substrates, different ratios of GALS and FSA enzymes to synthesize L-xylose.

### 3 结论

我国是能源大国, 碳排放量占全球 1/3, 发展以一碳为原料的工业生物转化过程, 有助于推动工业原料路线的战略转移。而且一碳化合物作为一种应用广泛的绿色能源物质, 其来源广泛, 廉价易得, 将一碳资源转变成生物体中间代谢产物不仅可以改善环境, 也能变废为宝。

本研究设计了以甲醛为底物, 经过两步催化反应利用甲醛来合成 L-木糖, 为一碳资源的利用奠定了一定的基础, 同时也为其他糖的合成提供了新思路。而且该途径从甲醛到 L-木糖两步反应在我们优化了底物浓度和酶比例之后, 总转化率高达 64%, 达到了一个比较高的水平, 因此, 以甲醛为原料来合成 L-木糖的生物途径具有重要意义。

总之, 本研究已经开发了一种使用工程化的 GALS 和 FSA 通过生物催化级联反应从简单分子甲醛制备 L-木糖的途径, 值得注意的是, L-木糖的制备具有最佳的能量利用和原子经济性, 同时避免了化学或生物催化方法所需的功能化和活化。接下来, 将继续寻找合适的醛缩酶或者改造 FSA 来合成其他单糖。

### REFERENCES

- [1] Orgel LE. The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem Sci*, 1998, 23(12): 491–495.
- [2] Delidovich IV, Simonov AN, Taran OP, et al. Catalytic formation of monosaccharides: from the formose reaction towards selective synthesis. *ChemSusChem*, 2014, 7(7): 1833–1846.
- [3] Decker P, Schweer H, Pohlmann R. Bioids: X. Identification of formose sugars, presumable prebiotic metabolites, using capillary gas chromatography/gas chromatography—mass spectrometry of *n*-butoxime trifluoroacetates on OV-225. *J Chromatogr A*, 1982, 244(2): 281–291.
- [4] Partridge RD, Weiss AH, Todd D. Branched-chain carbohydrate structures resulting from formaldehyde

- condensation. Carbohydrate Res, 1972, 24(1): 29–44.
- [5] de Bruijn JM, Kieboom APG, van Bekkum H. Alkaline degradation of monosaccharides VI<sup>1</sup>: the fructo-fobmose reaction of mixtures of D-fructose and formaldehyde. J Carbohydr Chem, 1986, 5(4): 561–569.
- [6] Breslow R. On the mechanism of the formose reaction. Tetrahedron Lett, 1959, 21(1): 22–26.
- [7] Simonov AN, Pestunova OP, Matvienko LG, et al. Possible prebiotic synthesis of monosaccharides from formaldehyde in presence of phosphates. Adv Space Res, 2007, 40(11): 1634–1640.
- [8] Delidovich IV, Tara OP, Simonov AN, et al. Photoinduced catalytic synthesis of biologically important metabolites from formaldehyde and ammonia under plausible “prebiotic” conditions. Adv Space Res, 2011, 48(3): 441–449.
- [9] Snytnikova OA, Simonov AN, Pestunova OP, et al. Study of the photoinduced formose reaction by flash and stationary photolysis. Mendeleev Commun, 2006, 16(1): 9–11.
- [10] Yoshihiro S, Yoshinobu M, Chikahiro S, et al. Formose reactions. II. the photochemical formose reaction. Bull Chem Soc Jpn, 1977, 50(1): 222–226.
- [11] Schwartz AW, De Graaf RM. The prebiotic synthesis of carbohydrates: a reassessment. J Mol Evol, 1993, 36(2): 101–106.
- [12] Castells J, López-Calahorra F, Geijo F. The formoin reaction. Carbohydrate Res, 1983, 116(2): 197–207.
- [13] Shigemasa Y, Okano A, Saimoto H, et al. The favored formation of DL-glycero-tetrol in the formose reaction. Carbohydrate Res, 1987, 162(2): c1–c3.
- [14] Shigemasa Y, Tanioka SI, Furukawa H, et al. The favored formation of threo-3-Pentulose in the formose reaction. J Carbohydrate Chem, 1991, 10(1): 97–100.
- [15] Shigemasa Y, Ueda T, Saimoto H. First synthesis of DL-2-C-hydroxymethyl-3-pentulose in the formose reaction. J Carbohydrate Chem, 1989, 8(4): 669–673.
- [16] Yoshihiro S, Takaaki U, Hiroyuki S. Formose reactions. XXVIII. selective formation of 2,4-bis(hydroxymethyl)-3-pentulose in *N,N*-dimethylformamide-water mixed solvent. Bull Chem Soc Jpn, 1990, 63(2): 389–394.
- [17] Matsumoto T, Yamamoto H, Inoue S. Selective formation of triose from formaldehyde catalyzed by thiazolium salt. J Am Chem Soc, 1984, 106(17): 4829–4832.
- [18] Siegel JB, Smith AL, Poust S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(12): 3704–3709.
- [19] Poust S, Piety J, Bar-Even A, et al. Mechanistic analysis of an engineered enzyme that catalyzes the formose reaction. Chem Bio Chem, 2015, 16(13): 1950–1954.
- [20] Lu XY, Liu YW, Yang YQ, et al. Constructing a synthetic pathway for acetyl-coenzyme a from one-carbon through enzyme design. Nat Commun, 2019, 10: 1378.
- [21] Gutierrez M, Parella T, Joglar J, et al. Structure-guided redesign of D-fructose-6-phosphate aldolase from *E. coli*: remarkable activity and selectivity towards acceptor substrates by two-point mutation. Chem Commun, 2011, 47(20): 5762–5764.
- [22] Szekrenyi A, Soler A, Garrabou X, et al. Engineering the donor selectivity of D-fructose-6-phosphate aldolase for biocatalytic asymmetric cross-aldol additions of glycolaldehyde. Chem—A Eur J, 2014, 20(39): 12572–12583.
- [23] Castillo JA, Guérard-Hélaine C, Gutiérrez M, et al. A mutant d-fructose-6-phosphate aldolase (Ala129Ser) with improved affinity towards dihydroxyacetone for the synthesis of polyhydroxylated compounds. Adv Synth Cataly, 2010, 352(6): 1039–1046.
- [24] Szekrenyi A, Garrabou X, Parella T, et al. Asymmetric assembly of aldose carbohydrates from formaldehyde and glycolaldehyde by tandem biocatalytic aldol reactions. Nat Chem, 2015, 7(9): 724–729.
- [25] Butlerow A. Formation synthétique d’une substance sucrée. CR Acad Sci, 1861, 53: 145–147.

(本文责编 郝丽芳)