

· 功能食品配料生物合成 ·

李勉 博士,浙江华康药业股份有限公司首席科学家。主持国家重点研发计划、省级领军型创新团队项目等多个国家级、省部级重大项目。长期从事生物化工的产业化技术研究和开发,在高效生物催化体系的表征与开发方面积累了深厚的理论基础和丰富的产品开发及产业化经验,特别是利用合成生物催化技术对农业废弃物进行资源化综合开发与高效利用,减少传统工业生产方式对自然资源的依赖和对环境的破坏。



生物法制备甘露醇研究进展

阎冬^{1#}, 蔡雪^{1,2#}, 薛海龙¹, 甄妮¹, 吴玉双¹, 柳志强², 李勉^{1*}, 郑裕国²

1 浙江华康药业股份有限公司, 浙江 开化 324302

2 浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014

阎冬, 蔡雪, 薛海龙, 甄妮, 吴玉双, 柳志强, 李勉, 郑裕国. 生物法制备甘露醇研究进展[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2626-2643.

YAN Dong, CAI Xue, XUE Hailong, ZHEN Ni, WU Yushuang, LIU Zhiqiang, LI Mian, ZHENG Yugu. Recent advances in the bioproduction of mannitol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2626-2643.

摘要: D-甘露醇是一种六碳糖醇,是自然界中含量最丰富的多元醇之一,具有抗氧化保护、调节渗透压和不可代谢等特性,已广泛应用于功能性食品和制药行业中。目前工业化生产 D-甘露醇的主要方法为化学加氢法。D-甘露醇也可由微生物代谢或者微生物催化生成,相比化学加氢法,生物法合成甘露醇不产生副产物山梨醇,且具有条件温和、专一性强、转化率高的优点。其中微生物发酵法的微生物菌种和发酵原料来源广泛易得,产物易于分离。微生物催化法采用多酶偶联的反应策略,利用工程菌产酶进行全细胞催化,同时引入辅因子循环途径使得昂贵的辅因子得到补充,可以在温和的条件下利用廉价底物获得较高的产率且没有副产物生成。然而,限制利用微生物法进行工业化生产 D-甘露醇的一个主要因素是成本昂贵,包括发酵培养基和底物成本高、耗费时间长等。本文综述了微生物法生产 D-甘露醇的方法,包括使用的高产发酵菌株及其发酵工艺、低成本底物的利用、全细胞催化法工程菌株开发策略以及高生产率的工艺调控等。生物法合成甘

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2105400); 浙江省“尖兵”“领雁”研发攻关计划(浙科发规 (2023C01113))

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2105400) and the Key R&D Program of Zhejiang Province (2023C01113).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: mian.li@huakangpharma.com

Received: 2024-03-13; Accepted: 2024-07-09

露醇不仅对促进产业升级、实现绿色制造具有重要意义，同时也为开发新型生物基产品、满足日益增长的市场需求提供了有力支持。随着技术创新和产业链的不断完善，未来其有望成为甘露醇生产的主要方式之一。

关键词：甘露醇生产；微生物发酵；全细胞催化；合成生物学；辅因子循环

Recent advances in the bioproduction of mannitol

YAN Dong^{1#}, CAI Xue^{1,2#}, XUE Hailong¹, ZHEN Ni¹, WU Yushuang¹, LIU Zhiqiang²,
LI Mian^{1*}, ZHENG Yuguo²

1 Zhejiang Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Kaihua 324302, Zhejiang, China

2 College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, Zhejiang, China

Abstract: D-mannitol is a six-carbon sugar alcohol and one of the most abundant polyols in the nature. With antioxidant and osmotic pressure-regulating effects and non-metabolism by the human body, D-mannitol has been widely used in functional food and pharmaceutical industries. At present, a major way for industrial production of D-mannitol is chemical hydrogenation. In addition, D-Mannitol can be produced by microbial metabolism or catalysis. Compared with the chemical hydrogenation, the microbial methods for synthesizing mannitol do not produce sorbitol as a by-product and have the advantages of mild reaction conditions, strong specificity, and high conversion rate. Microbial fermentation is praised for easy access of strains and raw materials and simple separation of the product. Microbial catalysis usually adopts a multi-enzyme coupling strategy, which uses enzymes produced by engineered bacteria for whole-cell catalysis, and the cofactor recycling pathway is introduced to replenish expensive cofactor. This method can achieve high yields with cheap substrates under mild conditions without the formation of by-products. However, the application of microbial methods in the industrial production of D-mannitol is limited by the high costs of fermentation media and substrates and the long reaction time. This article reviews the reported microbial methods for producing D-mannitol, including the use of high-yielding strains and their fermentation processes, the utilization of low-cost substrates, whole-cell catalytic strategies, and the process control for high productivity. The biosynthesis of mannitol is not only of great significance for promoting industrial upgrading and realizing green manufacturing, but also provides strong support for the development of new bio-based products to meet the growing market demand. With the continuous improvement of technological innovation and industrial chain, it is expected to become one of the main ways of mannitol production in the future.

Keywords: mannitol production; microbial fermentation; whole-cell catalysis; synthetic biology; cofactor recycling

D-甘露醇是一种无环六碳糖醇，是 D-山梨糖醇的同分异构体。D-甘露醇是自然界中含量最丰富的多元醇之一，存在于植物、地衣、藻类、真菌和细菌中^[1-2]。多种海藻都可以积累甘露醇，其中褐藻光合作用能够产生约 10%–20% 甘露醇，可占到干重的 20%–30%^[3]。一些藻类可能存在多个 D-甘露醇合成途径，还有一些藻类含有多个 D-甘露醇合成代谢过程中的同工酶基因，编码的酶具有不同的细胞定位。多代谢合成途径和多拷贝同功能基因表明 D-甘露醇生物合成在藻类中具有重要的生理功能^[4]。已经有研究证明 D-甘露醇作为碳源和渗透压调节剂，能够帮助生物体应对环境压力^[5]。

D-甘露醇是第一个被发现的天然结晶糖醇，其结晶为无色或白色针状或菱形，具有极低的吸湿性^[6]，25 °C时在水中的溶解度仅为 18% (质量体积比)，远低于大多数其他类型糖醇^[7-8]，甜度为蔗糖的 50%–70%，具有溶解水吸热性能，入口有清凉感。D-甘露醇的热量值为 1.6 kcal/g，比蔗糖(4.0 kcal/g)的低。另外，甘露醇的血糖指数(glycemic index, G.I.)为 0 (以葡萄糖 G.I.为 100)，热量值和 G.I.低于其他多元醇，例如山梨醇(2.7 kcal/g 和 9)和木糖醇(2.4 kcal/g 和 13)^[9]。由于这些特性，D-甘露醇可广泛应用于食品、化工、临床医疗等领域。人类身体不能代谢甘露醇，因此甘露醇可作为代糖类的食品添加剂^[10]，有研究发现甘露醇还有清除自由基的作用^[2]。D-甘露醇在欧盟被批准为营养甜味剂 E421，并获得了美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)授权^[11]。D-甘露醇也可作为药物配方剂^[12]，还可以作为特种化学品应用于化工行业^[13]。

目前，全球每年消耗约 15 万 t 的 D-甘露醇，占多元醇消耗总量的 11%左右。近年来，D-甘露醇作为功能性糖醇和低热量甜味剂的需求持

续增长。全球甘露醇市场较为集中，大型跨国公司为该行业的主要生产者，国外生产商主要包括嘉吉、罗盖特、SPI Polyols, Inc.等。我国主要生产商包括山东天力药业有限公司、石家庄华旭药业有限责任公司、广西南宁化学制药有限责任公司、青岛明月海藻集团有限公司等。D-甘露醇的生产方法包括自然提取、化学合成、微生物发酵和微生物催化。

D-甘露醇广泛存在于自然界许多植物的叶、茎、根中，其中提取效果比较好的是海藻，尤其是褐藻中含有 10%–20% 的 D-甘露醇^[14]，海带是褐藻的一种，从海带中提取是 D-甘露醇的传统生产方法。国内厂家如青岛明月海藻集团有限公司是国内最大的以植物提取法生产 D-甘露醇的企业。以新鲜或干海带为原料，将提碘后的海带浸泡液多次除杂、蒸发浓缩、冷却结晶得到 D-甘露醇^[15]。通过自然提取法可以得到高纯度的甘露醇产品，工艺流程简单，但该法也存在很多的不足，如原料受季节影响较大，原料供应稳定性不高且整体收率较低、产品生产成本高。近年来，提取原料来源种类不断丰富。2021 年，Huang 等^[16]以张氏马尾藻为原料对甘露醇提取工艺进行研究优化，得到最优提取条件，拓宽了甘露醇提取来源。在传统工艺提取得到甘露醇的过程中，除产物外，还含有大量的泥沙、悬浮物、糖胶、有机物及色素、盐分等杂质，仅靠传统悬系和活性炭吸附很难将杂质处理完全。因此，随着技术的迭代进步，目前采用膜集成技术辅助甘露醇的生产，苗钧魁等^[17]采用纳滤浓缩技术可使甘露醇收率由 65% 提高至 75%，生产成本降低至 8 000 元/t 以内，并在中试规模进行了测算验证。提取法产品天然，但其工艺成本高、环境友好性差。在该工艺路线中，后续新技术的开发聚焦于提高收率和降低成本等方向。

化学合成法生产的 D-甘露醇是在高温(120–160 °C)和高压(70–140 个大气压)条件下,使用雷尼镍催化剂,将 50% (体积分数)的果糖葡萄糖浆氢化转化为 30%的甘露醇和 70%山梨醇混合物^[14],之后通过低温结晶可得到甘露醇。化学加氢法优点是工艺可靠、原料利用率高且不受地理和季节限制,成本较低,但缺点是副产物山梨醇的高比例伴生导致甘露醇收率低,并由于需要使用高温高压,会有一定安全性问题^[14]。由于化学法的诸多缺点,生物法合成 D-甘露醇的生产工艺正在受到越来越多的关注。生物法生产工艺可促进甘露醇更广泛的应用,也有希望促进作为原料的淀粉产业的发展。

1 微生物发酵法

自然界微生物能够代谢合成甘露醇,用于胞内渗透压调节、物质转运、辅酶再生等生理活动^[6,18]。利用人工定向选育的优良微生物菌种可将葡萄糖、果糖、蔗糖、甘油等不同底物直接发酵转化为甘露醇,进一步分离精制发酵液可获得甘露醇成品。相比化学加氢合成甘露醇,发酵法具有专一性强、转化率高、副产物少(不产生副产物山梨醇)、条件温和、原料来源广泛、产物易于分离等特点^[19-20]。

高产菌株和发酵工艺是发酵生产甘露醇的关键。目前,研究采用筛选诱变和代谢工程策略已获得了大量高产甘露醇的菌种,在此基础上通过优化发酵工艺条件显著提高了甘露醇的产量。发酵生产甘露醇的微生物主要包括:(1) 细菌:主要是乳酸杆菌属(*Lactobacillus* sp.) B001、肠膜明串珠菌属(*Leuconostoc mesenteroides*)等;(2) 酵母菌:如木兰假丝酵母(*Candida magnolia*)、假丝酵母(*Torulopsis mannitofaciens*)和易变球拟酵母(*Torulopsis versatilis*)等;(3) 真菌(主要是丝状真菌):白曲霉(*Aspergillus candidus*)、黑曲霉

(*Aspergillus niger*)、土生须壳孢菌(*Pyrenochaeta terrestris*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)等。

不同微生物发酵生产甘露醇进展如表 1 所示。

1.1 细菌发酵产甘露醇

细菌发酵生产甘露醇主要由乳酸菌进行。乳酸菌是工业应用最广泛、最重要的微生物之一,被界定为是 GRAS (Generally Recognized as Safe)菌株,在发酵乳制品和益生菌等领域的研究历史悠久。在化工领域主要用于生产乳酸、甘露醇、1,3-丙二醇等精细化学品^[38]。

根据己糖代谢途径的不同,乳酸菌发酵被分为同型乳酸发酵和异型乳酸发酵(图 1),两种途径都可以合成甘露醇,但异型乳酸发酵要比同型乳酸发酵合成甘露醇的能力强^[20]。

1.1.1 同型乳酸发酵

葡萄糖作为底物进行同型乳酸发酵合成甘露醇过程中,经过磷酸转移酶系统(phosphotransferase system, PTS)首先将葡萄糖磷酸化为 6-磷酸葡萄糖,然后 6-磷酸葡萄糖被磷酸葡萄糖异构酶催化异构为 6-磷酸果糖,6-磷酸果糖再通过甘露醇-1-磷酸脱氢酶转变为 1-磷酸甘露醇,最后在甘露醇磷酸酶作用下脱磷酸生成甘露醇^[10]。

同型发酵合成甘露醇的乳酸菌有变形链球菌(*Streptococcus mutants*)、莱氏曼氏乳杆菌(*Lactobacillus leichmanii*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)等,这些野生型的同型发酵乳酸菌能够利用葡萄糖合成极少量的甘露醇,因而相关研究较少^[6]。

通过失活乳酸脱氢酶可提高甘露醇产量。Neves 等^[39]报道了利用乳酸脱氢酶缺陷的植物乳杆菌促进甘露醇的合成。Kim 等^[40]发现当乳酸脱氢酶失活不能再生烟酰胺腺嘌呤二核苷酸

表 1 微生物发酵生产甘露醇

Table 1 Microbial fermentation for the production of mannitol

Organisms	Culture type	Substrates	Temperature (°C)	pH	Time (h)	Mannitol (g/L)	Productivity (g/(L·h))	Yield (g/g)	References
Mannitol production by homofermentative LAB									
<i>Lactobacillus fermentum</i> NRRL B-1932	Batch	Glucose (50 g/L) Fructose (100 g/L)	40	5.0	11	83.1	7.60	0.90	[21]
<i>Lactobacillus fermentum</i> CRL 573	Batch	Glucose (10 g/L) Fructose (65 g/L)	37	5.0	24	56.8	2.40	0.93	[22]
<i>Lactobacillus intermedius</i> NRRL B-3693	Batch	Fructose (300 g/L)	37	5.0	136	198.0	1.45	0.66	[23]
	Fed-batch	Glucose: fructose (1:2)	37	5.0	92	202.5	2.20	0.68	
	Batch	SM and fructose syrups	37	5.0	22	104.8	4.76	0.69	[24]
	Batch	Fructose syrup (300 g/L)	37	5.0	67	201.0	2.98	0.65	[25]
	Batch	Inulin hydrolysate (initial inulin, 150 g/L)	37	5.0	34	106.0	3.12	ND	[26]
	SSF	Inulin (300 g/L)	37	5.0	72	207.0	2.88	0.69	
SSF	Inulin and fructose (TS, 400 g/L)	37	5.0	110	228.0	2.07	0.57		
Mannitol production by yeasts									
<i>Candida magnoliae</i> HH-01	Batch	Glucose (50 g/L) Fructose (250 g/L)	30	5.0	200	151.0	0.74	0.50	[27]
	Fed-batch	Fructose (30–120 g/L)	30	5.0	200	209.0	0.99	0.83	
	Fed-batch	Glucose (50 g/L) Fructose (250 g/L)	35	5.0	110	213.0	1.94	0.85	[28]
	Fed-batch	Glucose (10 g/L) Fructose (200 g/L)	30	5.0	110	66.0	0.60	0.33	[29]
<i>Candida magnoliae</i> R9	Two-stage fermenter	Glucose (100 g/L) Fructose (300 g/L)	28	5.0	60	240.0	4.00	0.81	[30]
	Batch	Glucose (200 g/L)	30	4.0	72	80.3	1.12	0.40	[31]
<i>Candida parapsilosis</i> SK26.001	Fed-batch	Glucose (284 g/L)	30	4.0	120	97.1	0.81	0.34	
<i>Candida magnoliae</i> NCIM 3470	Batch	Fructose (100 g/L)	28	NM	96	44.5	0.46	0.44	[32]
<i>Yarrowia lipolytica</i> AUV'1	Batch	Glycerol (150 g/L)	29.5	3.0	65	27.6	0.46	0.16	[33]
	Fed-batch	Glycerol (250 g/L)	29.5	3.0	131	38.1	0.29	0.15	
<i>Candida azyma</i> NBRC10406	Batch	Raw glycerol	28	6.0	168	50.8	0.30	0.30	[34]
Mannitol production by filamentous fungi									
<i>Aspergillus candidus</i>	Batch	Glucose (32 g/L)	31	5.5–6.0	288	22.0	0.08	0.69	[35]
<i>P. scabrosum</i> IBT JTER4	Batch	Sucrose (150 g/L)	25	6.2	288	43.0	0.15	0.40	[36]
<i>Penicillium</i> sp. T2-M10	Batch	Glucose (24 g/L)	28	ND	168	1.26	0.75×10^{-2}	0.05	[37]

SM: Sugarcane molasses; SSF: Simultaneous saccharification; TS: Total sugar concentration; NM: Not mentioned; ND: Not determined.

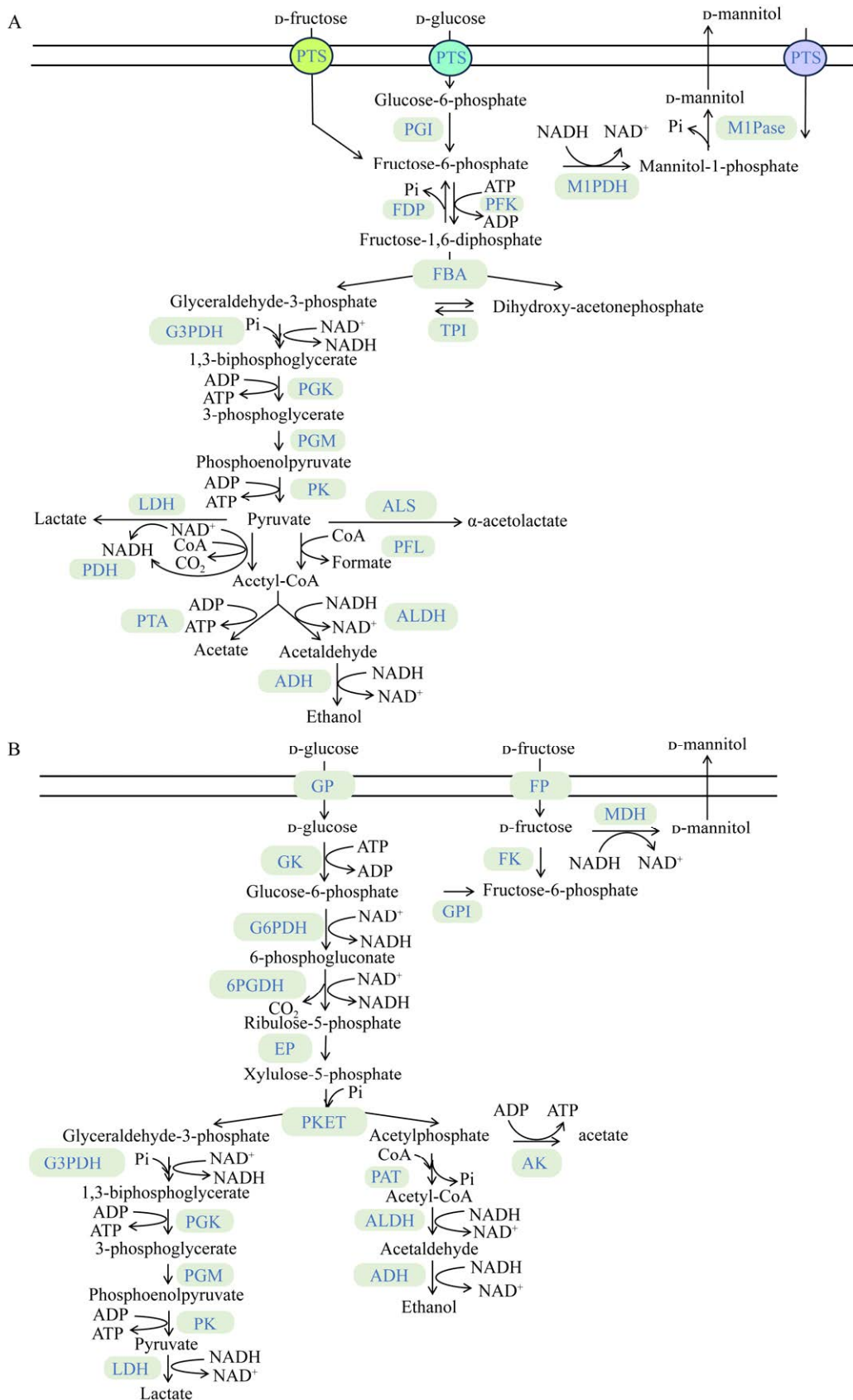


图 1 同型乳酸发酵和异型乳酸发酵己糖代谢途径 A: 同型乳酸发酵. B: 异型乳酸发酵. PTS: 磷酸烯醇丙酮酸依赖性糖磷酸转移酶系统; PGI: 磷酸葡萄糖异构酶; M1PDH: 甘露醇 1-磷酸脱氢酶; M1Pase: 甘露醇 1-磷酸酶; PFK: 6-磷酸果糖激酶; FDP: 果糖二磷酸酶; FBA: 果糖 1,6-二磷酸醛缩酶; TPI: 磷酸三糖异构酶; G3PDH: 3-磷酸甘油醛脱氢酶; PGK: 磷酸甘油酸激酶; PGM: 磷酸甘油变位酶和烯醇化酶; PK: 丙酮酸激酶; LDH: 乳酸脱氢酶; PDH: 丙酮酸脱氢酶; PTA: 磷酸乙酰转移酶; ACK: 乙酸激酶; PFL: 丙酮酸-甲酸裂解酶; ALDH: 乙醛脱氢酶; ADH: 乙醇脱氢酶; ALS: α -乙酰乳酸合酶; GP: 葡萄糖透过酶; FP: 果糖透过酶; GK: 葡萄糖激酶; G6PDH: 葡萄糖 6-磷酸脱氢酶; 6PGDH: 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; EP: 差向异构酶; PKET: 磷酸酮醇酶; FK: 果糖激酶; MDH: 甘露醇脱氢酶. Co-A: 辅酶 A; Acetyl-CoA: 乙酰辅酶 A

Figure 1 Pathway for hexose metabolism of homofermentative and heterofermentative LAB. A: Homofermentative LAB. B: Heterofermentative LAB. PTS: Phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system; PGI: Phosphoglucose isomerase; M1PDH: Mannitol 1-phosphate dehydrogenase; M1Pase: Mannitol 1-phosphatase; PFK: 6-phosphofructokinase; FDP: Fructose-diphosphatase; FBA: Fructose 1,6-biphosphate aldolase; TPI: Triosephosphate isomerase; G3PDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PGK: Phosphoglycerate kinase; PGM: Phosphoglyceromutase and enolase; PK: Pyruvate kinase; LDH: Lactate dehydrogenase; PDH: Pyruvate dehydrogenase; PTA: Phosphate acetyltransferase; ACK: Acetate kinase; PFL: Pyruvate-formate lyase; ALDH: Acetaldehyde dehydrogenase; ADH: Alcohol dehydrogenase; ALS: α -acetolactate synthase. GP: Glucose permease; FP: Fructose permease; GK: Glucokinase; G6PDH: Glucose 6-phosphate dehydrogenase; 6PGDH: 6-phosphogluconate dehydrogenase; EP: Epimerase; PKET: Phosphoketolase; FK: Fructokinase; MDH: Mannitol dehydrogenase; Co-A: Coenzyme A; Acetyl-CoA: Acetyl coenzyme A.

(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), 氧化还原失衡时, 菌株才会生成一些甘露醇。综上所述, 同型发酵乳酸菌的甘露醇产量低, 不是理想的甘露醇发酵菌株。

1.1.2 异型乳酸发酵

异型乳酸发酵主要通过磷酸解酮酶途径, 以果糖或葡萄糖和果糖的混合物为底物代谢合成甘露醇。若单独以果糖为底物时, 3 分子的果糖可以生成 2 分子的甘露醇, 因此最大理论摩尔产率约为 66.7%^[2,6]; 若采用摩尔比 2:1 的果糖/葡萄糖为底物时, 2 分子果糖理论上能够生成 2 分子的甘露醇, 果糖的摩尔转化率比单独使用果糖要高, 该过程中果糖主要作为合成甘露醇的底物和产生 NAD^+ , 葡萄糖主要作为碳源被利用后产生能量和还原力 NAD(P)H 以供细胞生长, 由于葡萄糖价格低于果糖, 所以

利用葡萄糖/果糖混合物共同发酵合成甘露醇更为经济^[6]。同型乳酸发酵和异型乳酸发酵的生物途径差异较大, 异型乳酸发酵产生的甘露醇远大于同型乳酸发酵^[41]。

异型乳酸发酵产甘露醇的主要是乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、明串珠菌属 (*Leuconostoc*)、酒球菌属 (*Oenococcus*) 等菌属的乳酸菌, 其中明串珠菌是典型的高产甘露醇菌株。例如, Saha 等^[23-26] 筛选了一株中间型乳杆菌 (*Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693), 以 300 g/L 果糖为底物进行分批发酵, 控制 pH 5.0, 37 °C 发酵 136 h 获得了 198.0 g/L 甘露醇; 相同果糖浓度进行分批补料发酵, 发酵 92 h 甘露醇产量达到 202.5 g/L; 进一步优化培养基, 采用糖蜜和糖浆为混合碳源, 发酵 22 h 后可生产甘露醇 104.8 g/L, 采用菊粉为原料发酵 110 h 甘露醇产量高达 228.0 g/L^[23-26]。

虽然乳酸菌发酵能够高产甘露醇，但过程中需要富含营养素(肽、氨基酸、生长因子等)的辅料，因此成本较高。

1.2 酵母菌发酵产甘露醇

研究早已证实大多数酵母菌能够产生一系列的糖醇^[27]，且酵母本身具有耐高糖、高渗等特点，利用高浓度葡萄糖、甘油等原料进行工业化大规模发酵生产糖醇类物质具有一定优势。在酵母中，合成甘露醇的途径通常为果糖被NADPH依赖型的甘露醇脱氢酶直接转化为甘露醇^[28]。也有酵母中同时存在两种甘露醇合成途径，另一种合成途径为6-磷酸果糖被催化生成1-磷酸甘露醇，之后脱磷酸生成甘露醇(图2)^[42]。

目前，研究用于发酵产甘露醇的酵母菌主要包括木兰假丝酵母(*C. magnolia*)、假丝酵母(*T. mannifaciens*)和易变球拟酵母(*T. versatilis*)等。早在1968年，Onishi等^[43]以甘油为碳源发酵培养球拟酵母获得了甘露醇。2002–2003年，韩国Hyun研究团队^[27-29]针对木兰假丝酵母(*C. magnolia*)发

酵产甘露醇进行了深入研究，2002年，该团队首先从发酵污泥中筛选获得了一株木兰假丝酵母(*Candida magnoliae*) HH-01，该菌株能够利用葡萄糖和果糖的混合糖发酵高产甘露醇，摇瓶发酵(初始果糖150 g/L)甘露醇浓度能够达到67 g/L，采用5 L发酵罐，使用250 g/L果糖和50 g/L葡萄糖进行分批发酵200 h甘露醇达到151.0 g/L，果糖转化率50%，时空产率0.74 g/(L·h)，过高的果糖浓度(>200 g/L)导致渗透压增加从而降低果糖的转化率^[43]。研究进一步采用分批补料发酵，将果糖浓度控制在30–120 g/L，发酵200 h后甘露醇的产量高达209.0 g/L，果糖转化率83%，时空产率1.03 g/(L·h)^[27]。在此基础上，Lee等^[28]通过进一步优化发酵条件，使甘露醇产量达到213.0 g/L，果糖转化率85%，时空产率1.94 g/(L·h)。利用葡萄糖和果糖混合发酵比单独使用果糖甘露醇产量更高，原因可能是葡萄糖能够通过戊糖磷酸途径促进NADPH再生，从而为甘露醇脱氢酶提供还原力并提高酶活力^[29]。

相比异型发酵乳酸菌，利用酵母菌生产甘露醇其时空产率总体上不如乳酸菌异型发酵，而且存在发酵过程中甘露醇再次利用的问题。

1.3 丝状真菌发酵产甘露醇

一些丝状真菌的菌丝体中含有少量的甘露醇^[44]，如烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)菌体含有110 mg/g(干重)甘露醇^[45]，米曲霉(*Aspergillus oryzae*)固态发酵过程中菌体中甘露醇含量为135–166 mg/g(干重)^[46]，这主要与胞内甘露醇的生物合成途径有关。早在1961年，Yamada等^[47]发现稻瘟病菌(*Piricularia oryzae*)能够利用葡萄糖产生甘露醇，对其机制进行研究发现，菌体胞内代谢酶先将葡萄糖转变为果糖-6-磷酸(fructose-6-phosphate, F-6-P)，然后还原为甘露醇-1-磷酸(mannitol-1-phosphate, M-1-P)，最后在辅酶NADH存在时M-1-P经过脱磷酸作用生

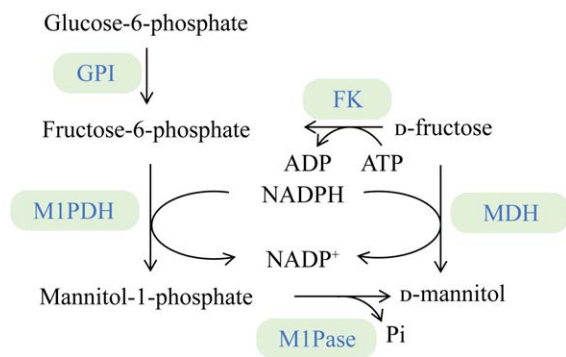


图2 酵母和真菌内的甘露醇合成途径 GPI:葡萄糖磷酸异构酶;FK:果糖激酶;MDH:甘露醇脱氢酶;M1PDH:甘露醇1-磷酸脱氢酶;M1Pase:甘露醇1-磷酸酶。

Figure 2 Mannitol biosynthetic pathways in yeast and fungi. GPI: Glucose phosphate isomerase; FK: Fructokinase; MDH: Mannitol dehydrogenase; M1PDH: Mannitol 1-phosphate dehydrogenase; M1Pase: Mannitol 1-phosphatase.

成甘露醇。除此途径之外,另一种由 6-磷酸果糖出发经过甘露醇 1-磷酸脱氢酶再脱磷酸的途径也被发现存在于丝状真菌中^[47](图 2)。

研究发现,许多丝状真菌能够利用葡萄糖、蔗糖等原料发酵产甘露醇(表 1)。通过人工分离筛选、紫外诱变和化学诱变剂处理等手段可提升丝状真菌生产甘露醇的能力。Hendriksen 等^[1]通过分离筛选获得了 11 个青霉属(*Penicillium* sp.)的不同菌株,其中一株高产糙梗青霉菌(*P. scabrosum*) IBT JTER4 利用蔗糖(150 g/L)和酵母粉于 25 °C 发酵 12 d 后甘露醇产量最高达到了 43.0 g/L。Duan 等^[37]对一株青霉菌(*Penicillium* sp.) T2-8 进行紫外(UV)和亚硝基胍(nitrosoguanidine, NTG)诱变处理,筛选获得稳定的突变株 *Penicillium* sp. T2-M10,以葡萄糖为原料进行发酵时甘露醇产量相比出发菌株提高了 125%,达 1.26 g/L。

通过以上异型发酵中间型乳杆菌(*L. intermedius*) NRRL B-3693 和木兰假丝酵母(*C. magnolia*) HH-01 的例子可以看出,分批补料发酵最终得到的产物浓度相对而言较高。分批补料发酵可以克服高底物浓度造成的限制,且可以防止发酵后期产生的甘露醇的消耗,有利于甘露醇的积累。发酵过程中的甘露醇的产率还会受 pH 值的影响。在异型乳酸发酵中,1 mol 葡萄糖或果糖代谢为 1 mol 乳酸和 1 mol 乙酸或乙醇,该过程产生的有机酸会降低发酵液的 pH 值,显著抑制菌体生长和甘露醇的生产。因此,pH 调控在提异型乳酸发酵生产甘露醇中有着重要的作用。在控制 *L. intermedius* NRRL B-3693 的 pH 为 5.0 进行发酵后,48 h 内甘露醇产量约为非最适 pH 发酵条件下的 3 倍^[48]。温度也是甘露醇发酵过程需要考虑的重要因素,在一种分段式发酵木兰假丝酵母(*C. magnolia*) R9 的尝试中,将细胞生长和产物生成分为两个阶段,并在产物生成阶段提升发酵温度至 37 °C,将最

终甘露醇产量提升了约 20%,达到了木兰假丝酵母发酵产甘露醇的最高产量 240 g/L^[30]。

综上,微生物发酵生产甘露醇的研究较多,目前已开发出大量的高产菌株和相适应的发酵工艺。相比于细菌和酵母菌,采用丝状真菌发酵生产甘露醇周期较长,产量普遍较低,优势不足,限制了在实际工业生产中的应用。然而,为了获得高浓度的甘露醇,发酵生产时需要添加果糖,生产甘露醇的最大瓶颈在于发酵过程需要添加果糖等高成本原料,尽管研究采用廉价的农业、工业废弃物进行发酵降低了发酵成本,相对甘露醇的市场价格,总体成本仍然较高。

2 微生物催化法

2.1 酶法制备甘露醇的关键酶和辅酶再生方法

在甘露醇脱氢酶(mannitol dehydrogenase, MDH)催化下,D-果糖直接转化为 D-甘露醇,该过程需要辅因子 NADH 或 NADPH 的参与(图 3)。

首次被报道的 MDH 晶体结构来源于真菌双孢蘑菇(*Agaricus bisporus*),结构解析显示 AbMDH 是短链脱氢酶家族的成员,在溶液中存在形式为四聚体,催化辅因子为 NADPH,具有金属离子 Ni²⁺结合位点,其催化残基为 Ser149、Tyr169 和 Lys173^[49]。在蜡叶枝孢霉(*Cladosporium herbarum*)中发现的 MDH 也是一种 NADP⁺/NADPH 依赖性的短链脱氢酶,大小为 28.5 kDa。ChMDH 可以在溶液中以单体、二聚体和四聚体的形式存在,并相应地以两种晶体结构的形式形成四聚体和更多的聚合体,具有金属离子 Na⁺和 Zn²⁺的结合位点。分析证实 Zn²⁺对四聚体的组装具有稳定作用^[50]。与之相对地,来自于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)的 MDH 为长链醇脱氢酶,存在形式为二聚体或四聚体,辅因子为 NAD⁺/NADH,其不包含保守的 Tyr 位

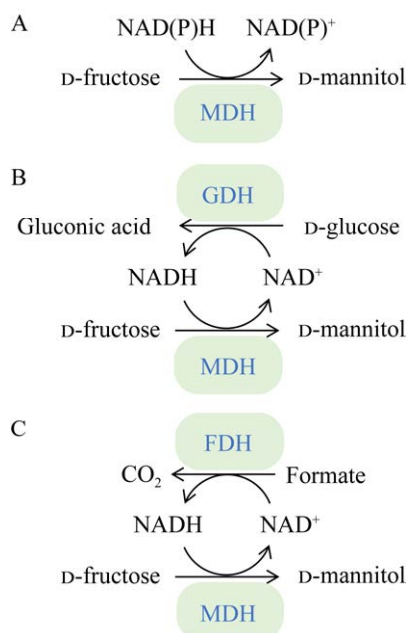


图 3 酶法催化合成 D-甘露醇 A: 甘露醇脱氢酶(MDH)转化 D-果糖生成 D-甘露醇. B: 甘露醇脱氢酶转化 D-果糖生成 D-甘露醇并通过葡萄糖脱氢酶(GDH)再生辅因子 NADH. C: 甘露醇脱氢酶转化 D-果糖生成 D-甘露醇并通过甲酸脱氢酶(FDH)再生辅因子 NADH.

Figure 3 Enzymatic synthesis of mannitol. A: Conversion of D-fructose to D-mannitol by MDH (mannitol dehydrogenase). B: D-mannitol production from D-fructose by MDH and the recycling of NADH through GDH (glucose dehydrogenase). C: D-mannitol production from D-fructose by MDH and the recycling of NADH through FDH (formate dehydrogenase).

点, 并且不依赖 Zn²⁺或其他金属离子来催化反应。序列分析表明, 与 PfMDH 结构相似性较高的是甘油-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、N-(1-D-羧乙基)-L-正缬氨酸脱氢酶、UDP-葡萄糖脱氢酶 (UDP-glucose dehydrogenase, UGDH) 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH), 表明这些酶之间可能存在进化关系^[51]。

参与反应的辅因子 NADH 或 NADPH 价格

昂贵, 是限制酶法催化甘露醇产量的主要因素。因此, 需要补充 NADH 或 NADPH 来解决这个问题。辅因子再生策略通常用添加辅助酶的方法来实现, 该方法具有专一性强、与整个反应体系相容性好的优点, 如图 3 所示。其中一种方法是通过葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 氧化葡萄糖生成葡萄糖酸而再生辅酶 NADH^[52]。此方法中, 葡萄糖廉价易得, 存在的问题是副产物葡萄糖酸和甘露醇难以分离, 且随着反应的进行, 反应体系的 pH 逐渐下降, 需要调控 pH^[53]。另一种辅酶再生方法是 MDH 偶联甲酸脱氢酶 (formate dehydrogenase, FDH), 甲酸在 FDH 的催化下转化为 CO₂, 同时伴随着 NADH 的生成, 用于 MDH 催化生成 D-甘露醇。该方法的缺点是甲酸成本相较葡萄糖要高, FDH 稳定性较差, 优点是副产物 CO₂ 容易与产物分离, 便于下游的提取纯化。

原核生物中发现的 MDH (EC 1.1.1.67) 通常为 NADH 依赖性, 在真核真菌和酵母中发现的 MDH (EC 1.1.1.138) 通常为 NADPH 依赖性, 但是也存在例外^[54]。目前已经有许多微生物来源的 NADH 依赖性的甘露醇脱氢酶被纯化和表征, 例如肠膜乳杆菌 (*L. mesenteroides*)^[55]、荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) DSM 50106^[56], 其酶学性质详情见表 2。大多数目前被报道的酶的最适温度为 30 °C 左右, 最适 pH 多为中性偏酸。对于各种 MDH 金属偏好性的研究结果表明, 金属离子对于 MDH 的催化活性具有较大的影响, 通常来说, 添加 Zn²⁺ 可以提高催化活性, 其他具有促进催化作用的金属离子还包括 Ni²⁺、Cu²⁺、Ca²⁺ 和 Mn²⁺^[57-59]。

在生产过程中经常会用到高温条件, 能在高温下工作的嗜热酶在工业应用中具有多种优势, 包括减少染菌的可能性、降低反应介质的黏度、促进反应正向进行等^[60]。来自于嗜嗜

热微生物的酶可以作为研究酶反应分子机制的范例来探究其热稳定性和功能性的机理^[61]。目前仅有少数的研究报道了从嗜热微生物发现的 MDH 的一些酶学性质(表 2)。2008 年, Song 等^[59]首次报道了一种来自嗜热微生物海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的甘露醇脱氢酶 TmMDH, 其在 90–100 °C 之间具有最佳催化活性, 120 °C 时可以保留 63% 的催化活性, 但在室温时未检测到催化活性, 热稳定性实验表明该酶在 80 °C 时半衰期为 57 min, 在 95 °C 时为 6 min。使用来自那不勒斯热袍菌(*T. neapolitana*)的木糖异构酶 TnXI 和 TmMDH 两步酶促转化 180 mmol/L 葡萄糖, 最终生成了 19.0 mmol/L D-甘露醇, 该反应过程没有添加辅因子再生机制, 可能是导致最终反应生成 D-甘露醇较少的原因。另一种来自嗜热微生物那不勒斯热袍菌(*T. neapolitana*) DSM4359 的 TnMDH 也已经被报道, 用大肠杆菌表达的重组 TnMDH 的最佳反应 pH 值为 6.5, 最适反应温度为 90 °C, 在 75 °C 下具有较好的热稳定性, 在 90 °C 下孵育 1 h 后可保持初始活性的一半, 利用大肠杆

菌重组纯化的 TnMDH 可以用 1% (质量体积比) D-果糖为原料生产 D-甘露醇, 转化率为 40%, TnMDH 酶的专一性较高, 高温下对木糖醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、甘露糖和木糖均没有催化活性^[62]。目前报道的热稳定性最好的 MDH 来自一种热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor morgani*) Rt8.B8, 75 °C 孵育 3 h 后酶活可保留 90% 以上, 95 °C 孵育 2.5 h 后相对酶活保持 50% 以上, 在 pH7.5, 温度 70 °C 时, CmMDH 和来自近多形汉逊酵母(*Ogataea parapolyomorpha*)的 FDH 添加比例 2:1 的条件下反应后, 400 mmol/L D-果糖转化率达到 80.0%, 表明该酶在工业化制备 D-甘露醇方面具有巨大潜力^[58]。

2.2 微生物催化法制备 D-甘露醇

1998 年, Slatner 等^[63]首次报道了利用大肠杆菌表达的来自荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) DSM 50106 的 NADH 依赖型的 PfMDH 和来自博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的甲酸脱氢酶 CbFDH 进行辅酶循环的策略, 在自制反应器中利用纯化的酶进行催化反应实现了 D-果糖转化为 D-甘露醇(表 3), D-甘露醇的产率达到

表 2 不同来源的甘露醇脱氢酶的性质比较

Table 2 Comparison of properties of mannitol dehydrogenase (MDH) from different sources

Species	T _{opt} (°C)	pH _{opt}	K _m (mmol/L)	Specific activity (U/mg)	Cofactor	Metal ion	References
<i>Agaricus bisporus</i>	NM	NM	29.3	NM	NADPH	Ni ²⁺	[49]
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30	5.4	35.0	70.0	NADH	Ni ²⁺	[55]
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	25	7.0–7.5	25.0	46.0	NADH	None	[56,63–64]
<i>Pseudomonas</i> sp. 1109	80	8.5	20.0	97.0	NADH	Zn ²⁺	[57]
<i>Caldicellulosiruptor morgani</i> Rt8.B8	75–80	8.0	18.0	115.0	NADH	Mn ²⁺	[58]
<i>Thermotoga maritima</i>	95	5.5–6.0	51.0	54.0	NADH	Zn ²⁺	[59]
<i>Thermotoga neapolitana</i>	90	6.5	20.0	86.0	NADH	Co ²⁺	[62]
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	NM	6.5	16.3	68.3	NADH	None	[65]
<i>Candida magnolia</i>	37	7.5	28.0	314.0	NM	NM	[66]
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	30	6.5	44.0	450.0	NADH	Zn ²⁺	[67]
<i>Leuconostoc intermedius</i>	35	5.5	25.0	331.0	NADPH	Zn ²⁺	[68]
<i>Platymonas subcordiformis</i>	NM	7.0	43.0	NM	NADH	Zn ²⁺	[69]

NM: Not mentioned.

表 3 微生物转化法制备甘露醇的策略

Table 3 Biotransformation strategies in the production of D-mannitol

System	Catalyst	Substrates	Yield	Enzyme amount	Conversion rate (%)	Time (h)	References
LpMDH	Whole cell	D-fructose	81.9 g/L	$OD_{600}=30.0$	81.0	24	[53]
BaGDH	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	100 g/L					
CmMDH	Pure enzyme	D-fructose	95.0 mmol/L	20% (V/V)	95.0	40	[58]
OpFDH		100 mmol/L					
		400 mmol/L	320.0 mmol/L		80.0		
TmMDH	Pure enzyme	D-glucose 180 mmol/L	19.0 mmol/L	1.0 mg/mL TmMDH	10.6	5	[59]
TnXI				0.772 mg/mL TnXI			
PfMDH	Pure enzyme	D-fructose	72.0 g/L	1.0 U/mL	80.0	48	[63]
CbFDH		500 mmol/L					
IA	Pure enzyme	Maltodextrin	214.3 mmol/L	1/2 000 IA	86.0	48	[71]
α GP		10 g/L and 50 g/L		7.5 U/mL α GP			
PGM				10.0 U/mL PGM			
PGI				2.5 U/mL PGI			
M1PDH				5.0 U/mL M1PDH			
M1Pase				2.5 U/mL M1Pase			
FDH				5.0 U/mL FDH			
4GT				0.1 U/mL 4GT			
PPGK				1.0 U/mL PPGK			
LpMDH	Pure enzyme	D-fructose	80.0 mmol/L	25.0 U/L	80.0	50	[66]
CbFDH		100 mmol/L					
LpMDH	Whole cell	D-fructose	39.3 g/L	2.9 g /L (dry cell)	43.7	48	[72]
MvFDH	<i>Bacillus megaterium</i>	90 g/L					
LpMDH	Whole cell	D-fructose	362.0 mmol/L	3.0 g/L (dry cell)	72.0	8	[73]
MvFDH	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	500 mmol/L					
ZmGLF	<i>Streptomyces rubiginosus</i> GI	D-glucose 1 000 mmol/L	821.0 mmol/L	5 g /L (dry cell) 2 g/L SrGI	82.0	40	[70]
LpMDH	Whole cell	D-fructose	87.0 g/L	2.9 g/L (dry cell)	95.0	24	[74]
MvFDH	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	500 mmol/L					
ZmGLF							

MDH: Mannitol-2-dehydrogenase; FDH: Formate dehydrogenase; XI: Xylose isomerase; GI: Glucose isomerase; IA: Isoamylase; α GP: α -glucan phosphorylase; PGM: Phosphoglucomutase; PGI: Phosphoglucose isomerase; M1PDH: Mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase; M1Pase: Mannitol 1-phosphatase; 4GT: 4- α -glucanotransferase; PPGK: Polyphosphate glucokinase.

2.25 g/(L·h), 终浓度达到 72.0 g/L, 底物 D-果糖转化率为 80.0%。2005 年, Kaup 等^[70]首次报道了利用大肠杆菌工程菌进行全细胞生物催化的反应系统, 在大肠杆菌中过表达来自假肠膜明串珠菌(*L. pseudomesenteroides*) ATCC 12291 的甘露醇脱氢酶 LpMDH 和来自母牛分枝杆菌

(*Mycobacterium vaccae*) N10 的甲酸脱氢酶基因 MvFDH, 利用工程菌细胞可催化 D-果糖合成 D-甘露醇。进一步过表达葡萄糖转运蛋白基因 (glucose-facilitated diffusion transporter, *glf*), 使细胞能够有效吸收 D-果糖而减少磷酸化。用过表达 3 种蛋白的工程菌休止细胞作为催化剂,

在菌体添加量为 3 g/L (干重计) 并添加甲酸进行 pH 控制的条件下, 24 h 后 D-甘露醇产率为 84%, 进一步研究以葡萄糖为底物合成 D-甘露醇的工艺, 在反应体系中加入葡萄糖异构酶, 使得最终底物转化率达到 82.0%。

在用葡萄糖脱氢酶 GDH 作为辅酶再生的尝试中, 已经实现了利用大肠杆菌共表达 LpMDH 和来自于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的葡萄糖脱氢酶 BaGDH 转化 D-果糖合成 D-甘露醇。通过调节两种酶的比例, 提高 BaGDH 的拷贝量来提高辅酶的循环能力, 在反应温度 30 °C, 初始 pH 值 6.5, 添加菌体量 $OD_{600}=30.0$, 主底物 D-果糖 100 g/L, 辅底物 D-葡萄糖与主底物 D-果糖摩尔比 1:1 的条件下, 在 5 L 发酵罐转化 24 h, D-甘露醇的最高产量为 81.9 g/L^[53]。Wei 等^[71]报道了一种以淀粉为底物生产 D-甘露醇的新方法, 该反应体系为纯酶催化体系, 由 3 个反应模块组成, 在模块 1 中, 淀粉的 α -1,6-糖苷键水解生成直链淀粉, 模块 2 包括了用 FDH 进行辅因子再生的 D-甘露醇生成过程, 包含 6 个酶催化反应; 模块 3 中, 淀粉完全转化为葡萄糖, 用于直接合成 D-甘露醇, 在优化酶添加量、磷酸添加量、 NAD^+ 添加量的条件下, 使用 10 g/L 和 50 g/L 的麦芽糖糊精作为底物实现了 95%–98% 的高产品收率, 为工业化合成 D-甘露醇奠定了一定的基础。然而, 多酶反应的系统调控复杂, 每个酶的最适反应条件均有差异, 在工艺上操作需要摸索较多的因子以达到一个最优条件, 这一过程会使得有些酶难以发挥其最优功能, 实现起来有一定的难度。

3 总结与展望

尽管 D-甘露醇可以通过天然提取、化学合成、微生物发酵和酶法催化获得, 然而出于经

济成本考虑, 目前市售 D-甘露醇主要通过提取和化学加氢方法生产。近年来, 随着工业绿色低碳转型, 低碳、清洁的工业生产方式越来越受到重视。因此, 未来 D-甘露醇采用低成本、低能耗、低污染、低排放的生物制造将是趋势, 通过对低成本底物的利用、工程菌株的开发以及发酵和催化工艺调控策略的深入研究, 使得以更经济的方式生产 D-甘露醇成为可能。

微生物发酵和微生物催化是 D-甘露醇主要的生物合成方法, 对比不同的几种微生物的发酵情况来看, 几种异型发酵型乳酸菌和木兰假丝酵母 (*C. magnoliae*) 是目前研究较多、发酵工艺最成熟的具有商业化生产潜力的菌种。异型发酵乳酸菌产量高, 但是使用该菌种存在的问题是耗时长, 且发酵过程中需要富含各种营养的辅料, 培养基成本高, 在发酵过程中也容易有副产物有机酸的积累, 导致产物难以分离, 因此对于发酵的 pH 的精确调控尤为重要。木兰假丝酵母 (*C. magnoliae*) 发酵最终甘露醇产量和异型乳酸菌相当, 并且耐高渗条件, 因此可利用高浓度碳源进行培养。酵母发酵时长通常较异型发酵乳酸菌长, 相比较而言时空产率低, 且在发酵过程中存在甘露醇被再次利用的问题。但是通过精确控制温度和 pH, 也可以达到较高的时空产率。整体来看, 微生物发酵法生产甘露醇耗时较长, 在添加正常碳源的同时也需要添加底物果糖, 且约 1/3 的底物果糖用于辅因子再生, 因此最大理论摩尔产率约为 66.7%, 需要同时添加果糖和葡萄糖来提高底物的摩尔转化率, 且发酵过程为了菌体快速生长需要添加较为昂贵的辅料, 导致原材料和能源成本增加。随着合成生物学技术的广泛应用, 未来有望从廉价原料出发, 设计开发新型高效的基因表达调控元件用于构建经济高效的甘露醇微生物细胞工厂, 在提高甘露醇产量的同时

降低发酵成本,但是开发新菌种的不确定性大、耗时长,目前降低成本难度仍然较高。

酶催化方法主要采用多酶偶联反应策略,通过多个连续反应模块直接将淀粉逐步分解成葡萄糖,并以其为底物通过酶催化法生成 D-甘露醇,此方法为实现高效生产提供了有力的技术支持。纯酶催化反应存在较高的反应条件要求和获得难度,因此不适于大规模生产。全细胞催化法因其反应条件温和、对环境要求不苛刻、产率高、副产物少等特点,成为目前较为理想的 D-甘露醇制备方法。然而,全细胞催化法仍需要解决一些挑战,其中最主要的问题之一是辅因子的再生,尤其在野生菌株中难以实现。目前已经开发出了用于全细胞催化的工程菌,在表达甘露醇脱氢酶 MDH 的同时,表达葡萄糖脱氢酶 GDH 或甲酸脱氢酶 FDH 进行辅因子的再生的方法来减少昂贵的辅因子添加,并已成功应用于大肠杆菌、巨大芽孢杆菌和谷氨酸棒状杆菌中。为了解决底物 D-果糖较为昂贵的问题,通过构建工程菌株,使菌株能够直接利用更廉价的葡萄糖作为底物来转化生成 D-甘露醇,并在大肠杆菌中实现。全细胞催化法还存在另一个问题是反应耗时长,需要挖掘酶活更高的酶,优化工程菌的表达系统,以提高酶的表达量和催化效率。另外,尽管添加了辅酶循环系统,辅因子的平衡仍可能受到影响,需要更多的尝试,如挖掘更高效的辅助酶、优化辅助酶拷贝数、提升表达量等。固定化酶可能是一种解决方案,延长了酶的保存时间和使用寿命,从而使得催化过程在实际生产中更加稳定。

总体来看,微生物发酵法和微生物催化法各有优劣,在实际应用中可根据实际情况选择适合的生产工艺。微生物发酵法的菌种可以为野生菌种,考虑到基因工程菌改造的设备要求

和较高的改造成本,发酵法的菌种获得性相较于微生物催化法更容易。然而,为了得到更高产的菌株,通常也要用到诱变筛选或基因工程菌,这也增加了菌种获取难度。另外,微生物催化法的操作需要发酵产酶和酶催化两个步骤,相比较而言微生物发酵法的操作可能更简单。但是发酵法生产 D-甘露醇的决定因素在于发酵条件的精准控制,包括温度、pH 和溶氧等,以减少培养基改变对于微生物细胞生长和副产物的积累。而对于微生物催化法的工程菌而言,如果设计得当,其效率和产率相较于微生物发酵可以具有较大的优势。这就需要在最初设计时就考虑到实际的应用场景,例如需要底盘微生物在生长快、耐受性好的同时具有较好的产酶效率,反应的关键酶也要进行筛选优化,并且需要摸索一系列的反应条件等,使得微生物催化过程达到较为理想的效果。在这一领域仍需持续努力,以进一步推动 D-甘露醇的生产工艺的创新与发展。

REFERENCES

- [1] HENDRIKSEN HV, MATHIASSEN TE, ADLER-NISSEN J, FRISVAD JC, EMBORG C. Production of mannitol by *Penicillium* strains[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 1988, 43(3): 223-228.
- [2] WISSELINK HW, WEUSTHUIS RA, EGGINK G, HUGENHOLTZ J, GROBBEN GJ. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(2/3): 151-161.
- [3] GROISILLIER A, SHAO ZR, MICHEL G, GOULITQUER S, BONIN P, KRAHULEC S, NIDETZKY B, DUAN DL, BOYEN C, TONON T. Mannitol metabolism in brown algae involves a new phosphatase family[J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(2): 559-570.
- [4] TONON T, LI Y, MCQUEEN-MASON S. Mannitol biosynthesis in algae: more widespread and diverse than previously thought[J]. The New Phytologist, 2017, 213(4): 1573-1579.
- [5] PATEL TK, WILLIAMSON JD. Mannitol in plants,

- fungi, and plant-fungal interactions[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(6): 486-497.
- [6] SAHA BC, RACINE FM. Biotechnological production of mannitol and its applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(4): 879-891.
- [7] SOETAERT W, VANHOOREN PT, VANDAMME EJ. The production of mannitol by fermentation[M]// Carbohydrate Biotechnology Protocols, 1999: 261-275.
- [8] DAI YW, MENG Q, MU WM, ZHANG T. Recent advances in the applications and biotechnological production of mannitol[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 36: 404-409.
- [9] GREMBECKA M. Sugar Alcohols as Sugar Substitutes in Food Industry[M]. Sweeteners. Cham: Springer, 2018: 547-573.
- [10] SONG SH, VIEILLE C. Recent advances in the biological production of mannitol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(1): 55-62.
- [11] GREMBECKA M. Sugar alcohols: their role in the modern world of sweeteners: a review[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(1): 1-14.
- [12] O'BRIEN-NABORS L. Alternative Sweeteners, Third Edition, Revised and Expanded[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001.
- [13] SOETAERT W, SCHWENGERS D, BUCHHOLZ K, VANDAMME E. A wide range of carbohydrate modifications by a single microorganism: *Leuconostoc mesenteroides*[J]. Progress in Biotechnology, 1995, 10: 351-358.
- [14] HU MY, ZHANG T. Research progress on mannitol production by microbial fermentation[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(18): 245-251.
- [15] ZHANG GF, LIU HW, FENG QZ, PEI ZQ, ZHAO GJ, LU YJ. Process for extracting mannitol from kelp soak solution by using membrane method: CN1259295C[P]. 2006-06-14.
- [16] HUANG YJ, LI YY, CHEN XY, XIE EY. Extraction technology of mannitol in *Sargassum zhangii*[J]. Food Research and Development, 2021, 42(23): 107-110.
- [17] 苗钧魁, 林成斌, 王斌, 丁昌宾, 冷凯良. 纳滤浓缩技术在海藻化工甘露醇提取工艺上的应用研究[J]. 水处理技术, 2014, 40(8): 92-96.
- MIAO JK, LIN CB, WANG B, DING CB, LENG KL. Application of nanofiltration concentration technology in mannitol extraction from seaweed chemical industry[J]. Technology of Water Treatment, 2014, 40(8): 92-96 (in Chinese).
- [18] CHEN M, ZHANG WL, WU H, GUANG CE, MU WM. Mannitol: physiological functionalities, determination methods, biotechnological production, and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(16): 6941-6951.
- [19] ZHANG M, GU L, CHENG C, MA JF, XIN FX, LIU JL, WU H, JIANG M. Recent advances in microbial production of mannitol: utilization of low-cost substrates, strain development and regulation strategies[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(3): 41.
- [20] NELSON GE, JOHNSON DE, CIEGLER A. Production of D-mannitol by conidia of *Aspergillus candidus*[J]. Applied microbiology, 1971, 22(3): 484-485.
- [21] von WEYMARN N, HUIJANEN M, LEISOLA M. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(11): 1207-1213.
- [22] RODRÍGUEZ C, RIMAUX T, FORNAGUERA MJ, VRANCKEN G, de VALDEZ GF, de VUYST L, MOZZI F. Mannitol production by heterofermentative *Lactobacillus reuteri* CRL 1101 and *Lactobacillus fermentum* CRL 573 in free and controlled pH batch fermentations[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(6): 2519-2527.
- [23] SAHA BC, NAKAMURA LK. Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2003, 82(7): 864-871.
- [24] SAHA BC. A low-cost medium for mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(4): 676-680.
- [25] SAHA BC. Effect of salt nutrients on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2006, 33(10): 887-890.
- [26] SAHA BC. Production of mannitol from inulin by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(5): 991-995.
- [27] SONG KH, LEE JK, SONG JY, HONG SG, BAEK H, KIM SY, HYUN HH. Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae*[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(1): 9-12.
- [28] LEE JK, SONG JY, KIM SY. Controlling substrate

- concentration in fed-batch *Candida magnoliae* culture increases mannitol production[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(3): 768-775.
- [29] BAEK H, SONG KH, PARK SM, KIM SY, HYUN HH. Role of glucose in the bioconversion of fructose into mannitol by *Candida magnoliae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(10): 761-765.
- [30] SAVERGAVE LS, GADRE RV, VAIDYA BK, JOGDAND VV. Two-stage fermentation process for enhanced mannitol production using *Candida magnoliae* mutant R9[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36(2): 193-203.
- [31] MENG Q, ZHANG T, WEI WT, MU WM, MIAO M. Production of mannitol from a high concentration of glucose by *Candida parapsilosis* SK26.001[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 181(1): 391-406.
- [32] KHAN A, BHIDE A, GADRE R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(20): 4911-4913.
- [33] TOMASZEWSKA L, RYWIŃSKA A, GŁADKOWSKI W. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(9): 1333-1343.
- [34] YOSHIKAWA J, HABE H, MORITA T, FUKUOKA T, IMURA T, IWABUCHI H, UEMURA S, TAMURA T, KITAMOTO D. Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(7): 2947-2953.
- [35] SMILEY KL, CADMUS MC, LIEPINS P. Biosynthesis of D-mannitol from D-glucose by *Aspergillus candidus*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1967, 9(3): 365-374.
- [36] LIANG PX, CAO MF, LI J, WANG QH, DAI ZJ. Expanding sugar alcohol industry: Microbial production of sugar alcohols and associated chemocatalytic derivatives[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 64: 108105.
- [37] DUAN RT, LI HT, LI HY, TANG LH, ZHOU H, YANG XQ, YANG YB, DING ZT. Enhancing the production of D-mannitol by an artificial mutant of *Penicillium* sp. T2-M10[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2018, 186(4): 990-998.
- [38] SAUER M, RUSSMAYER H, GRABHERR R, PETERBAUER CK, MARX H. The efficient clade: lactic acid bacteria for industrial chemical production[J]. *Trends in Biotechnology*, 2017, 35(8): 756-769.
- [39] NEVES AR, RAMOS A, SHEARMAN C, GASSON MJ, ALMEIDA JS, SANTOS H. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using *in vivo* ¹³C-NMR[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(12): 3859-3868.
- [40] KIM CY, LEE JH, KIM BH, YOO SK, SEO ES, CHO KS, DAY DF, KIM D. Production of mannitol using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2002, 7: 234-236.
- [41] MARTÍNEZ-MIRANDA JG, CHAIREZ I, DURÁN-PÁRAMO E. Mannitol production by heterofermentative lactic acid bacteria: a review[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(6): 2762-2795.
- [42] GONÇALVES C, FERREIRA C, GONÇALVES LG, TURNER DL, LEANDRO MJ, SALEMA-OOM M, SANTOS H, GONÇALVES P. A new pathway for mannitol metabolism in yeasts suggests a link to the evolution of alcoholic fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2510.
- [43] ONISHI H, SUZUKI T. Production of D-mannitol and glycerol by yeasts[J]. *Applied Microbiology*, 1968, 16(12): 1847-1852.
- [44] SOLOMON PS, WATERS ODC, OLIVER RP. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi[J]. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(6): 257-262.
- [45] VÉLÉZ H, GLASSBROOK NJ, DAUB ME. Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*[J]. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 2007, 44(4): 258-268.
- [46] RUIJTER GJG, VISSER J, RINZEMA A. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation[J]. *Microbiology*, 2004, 150(Pt 4): 1095-1101.
- [47] YAMADA H, OKAMOTO K, KODAMA K, NOGUCHI F, TANAKA S. Enzymatic studies on mannitol formation by *Piricularia oryzae*[J]. *Journal of Biochemistry*, 1961, 49: 404-410.
- [48] SAHA BC, RACINE FM. Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 553-560.

- [49] HÖRER S, STOOP J, MOOIBROEK H, BAUMANN U, SASSOON J. The crystallographic structure of the mannitol 2-dehydrogenase NADP⁺ binary complex from *Agaricus bisporus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(29): 27555-27561.
- [50] NÜSS D, GOETTIG P, MAGLER I, DENK U, BREITENBACH M, SCHNEIDER PB, BRANDSTETTER H, SIMON-NOBBE B. Crystal structure of the NADP-dependent mannitol dehydrogenase from *Cladosporium herbarum*: implications for oligomerisation and catalysis[J]. *Biochimie*, 2010, 92(8): 985-993.
- [51] KAVANAGH KL, KLIMACEK M, NIDETZKY B, WILSON DK. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* mannitol 2-dehydrogenase binary and ternary complexes: Specificity and catalytic mechanism[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(45): 43433-43442.
- [52] CHENAULT HK, SIMON ES, WHITESIDES GM. Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis[J]. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1988, 6: 221-270.
- [53] PAN S, HU MK, PAN XW, LYU QL, ZHU RS, ZHANG X, RAO ZM. Efficient biosynthesis of D-mannitol by coordinated expression of a two-enzyme cascade[J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, 38(7): 2549-2565.
- [54] LIU SQ, SAHA B, COTTA M. Cloning, expression, purification, and analysis of mannitol dehydrogenase gene *mtlK* from *Lactobacillus brevis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121(1): 391-401.
- [55] SAKAI S, YAMANAKA K. Crystallized-mannitol: NAD oxidoreductase from *Leuconostoc mesenteroides*[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1968, 32(7): 894-899.
- [56] BRÜNKER P, ALTENBUCHNER J, KULBE KD, MATTES R. Cloning, nucleotide sequence and expression of a mannitol dehydrogenase gene from *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 in *Escherichia coli*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, 1351(1/2): 157-167.
- [57] LU FZ, XU W, WU H, ZHANG WL, GUANG CE, MU WM. Purification and characterization of recombinant mannitol dehydrogenase from *P. bacterium* 1109[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(19): 137-143, 165.
- [58] XU W, LU FZ, WU H, ZHANG WL, GUANG CE. Identification of a highly thermostable mannitol 2-dehydrogenase from *Caldicellulosiruptor morgani* Rt8.B8 and its application for the preparation of D-mannitol[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 96: 194-201.
- [59] SONG SH, AHLUWALIA N, LEDUC Y, DELBAERE LTJ, VIEILLE C. *Thermotoga maritima* TM0298 is a highly thermostable mannitol dehydrogenase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81(3): 485-495.
- [60] ANTRANIKIAN G, VORGAS CE, BERTOLDO C. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2005, 96: 219-262.
- [61] VIEILLE C, ZEIKUS GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2001, 65(1): 1-43.
- [62] KOKO MYF, HASSANIN HAM, LETSIDIDI R, ZHANG T, MU WM. Characterization of a thermostable mannitol dehydrogenase from hyperthermophilic *Thermotoga neapolitana* DSM 4359 with potential application in mannitol production[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016, 134: 122-128.
- [63] SLATNER M, NAGL G, HALTRICH D, KULBE KD, NIDETZKY B. Enzymatic production of pure D-mannitol at high productivity[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 1998, 16(5): 351-363.
- [64] SLATNER M, NIDETZKY B, KULBE KD. Kinetic study of the catalytic mechanism of mannitol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(32): 10489-10498.
- [65] SCHNEIDER KH, GIFFHORN F. Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 184(1): 15-19.
- [66] BAEK H, LEE YB, HYUN HH. Molecular cloning and sequence analysis of a mannitol dehydrogenase gene and isolation of *mdh* promoter from *Candida magnoliae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(8): 1089-1094.
- [67] PARMENTIER S, ARNAUT F, SOETAERT W, VANDAMME EJ. Enzymatic production of D-mannitol with the *Leuconostoc pseudomesenteroides* mannitol dehydrogenase coupled to a coenzyme regeneration

- system[J]. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2005, 23(1): 1-7.
- [68] SAHA BC. Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus intermedius*[J]. *Biotechnology Progress*, 2004, 20(2): 537-542.
- [69] RICHTER DFE, KIRST GO. D-mannitol dehydrogenase and D-mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Platymonas subcordiformis*: some characteristics and their role in osmotic adaptation[J]. *Planta*, 1987, 170(4): 528-534.
- [70] KAUP B, BRINGER-MEYER S, SAHM H. D-mannitol formation from D-glucose in a whole-cell biotransformation with recombinant *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 69(4): 397-403.
- [71] WEI XL, LI QZ, HU CC, YOU C. An ATP-free *in vitro* synthetic enzymatic biosystem facilitating one-pot stoichiometric conversion of starch to mannitol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(5): 1913-1924.
- [72] BÄUMCHEN C, ROTH AHFJ, BIEDENDIECK R, MALTEN M, FOLLMANN M, SAHM H, BRINGER-MEYER S, JAHN D. D-mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*[J]. *Biotechnology Journal*, 2007, 2(11): 1408-1416.
- [73] KAUP B, BRINGER-MEYER S, SAHM H. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(3): 333-339.
- [74] BÄUMCHEN C, BRINGER-MEYER S. Expression of *glf* Z.m. increases D-mannitol formation in whole cell biotransformation with resting cells of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 545-552.

(本文责编 郝丽芳)