

一锅法全细胞催化合成胞苷三磷酸的研究

沈来伟,任宇红*

(华东理工大学生物工程学院,生物反应器工程国家重点实验室,上海200237)

摘要:分别在大肠杆菌 BL21(DE3) 中构建胞苷激酶(CDK)与乙酸激酶(ACK)的共表达及融合表达体系和胞苷酸激酶(CMK)与乙酸激酶(ACK)的融合表达体系,其中融合菌株 SUMO-CDK-L2-ACK 与 CMK-L2-ACK 构成的双融合催化体系具有较好的催化活性。搭建了双融合菌全细胞一锅法催化合成胞苷三磷酸(CTP)反应体系,并对其温度、pH、金属离子、乙酰磷酸投加量及菌粉投加量等进行优化。结果表明,在优化反应体系中,反应 75 min 时 CTP 产量达到最高为 108 mmol/L,总收率达 86.4%,实现了 CTP 的一锅法高效合成。

关键词:胞苷三磷酸;全细胞催化;一锅法合成;共表达;融合表达

中图分类号:Q819

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2024)04-0169-06

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2024.04.032

One-pot whole-cell catalytic synthesis of cytidine triphosphate

SHEN Lai-wei, REN Yu-hong*

(The State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Cytidine triphosphate (CTP) is synthesized through a one-pot whole-cell catalysis pathway with cytidine as substrate. The co-expression and fusion expression systems of cytidine kinase (CDK) and acetate kinase (ACK), and the fusion expression system of cytidylate kinase (CMK) and ACK are respectively constructed in *Escherichia coli* BL21 (DE3), in which the dual fusion catalytic system composed of SUMO-CDK-L2-ACK fusion strain and CMK-L2-ACK fusion strain is found to have better catalytic activity. A dual fusion strains whole-cell one-pot catalysis reaction system is established for the synthesis of CTP. The system is optimized in terms of temperature, pH, metal ions, acetyl phosphate dosage and bacterial powder dosage. It is indicated that in the optimized reaction system, the highest CTP yield reaches 108 mmol·L⁻¹ in 75 min, and the total yield reaches 86.4%, which realizes the efficient one-pot synthesis of CTP.

Key words: cytidine triphosphate; whole-cell catalysis; one-pot synthesis; co-expression; fusion expression

胞苷三磷酸(Cytidine triphosphate, CTP)在细胞的生长代谢、体内能量的储存与转化、免疫反应及信号传导中发挥着极其重要的作用^[1]。随着对 CTP 研究的深入,发现其在构建血管壁细胞膜和神经胶质细胞及调节神经细胞等方面,特别是对神经细胞损伤引起的疾病有着重要的治疗作用^[2-3],如脑梗死^[4]、听觉神经系统损伤^[5-6]及重型颅脑损伤^[7]等。CTP 也是合成 mRNA 疫苗和聚肌胞的主要原料之一,但如何提高产量、降低生产成本是目前亟需解决的问题。

目前 CTP 的合成主要采用生物催化法。刘杰等^[8]用啤酒酵母催化 CMP 合成 CTP,通过优化反应条件其转化率达到 59.01%;赵瑞^[9]用酿酒酵母构建全细胞催化体系,CTP 转化率达到 90.1%;Lee 等^[10]构建了过表达 CMP 激酶的重组大肠杆菌用于

催化合成 CTP,最终 CTP 转化率达到 80%。然而这些方法存在原料来源有限且生产成本较高等问题。

利用廉价底物胞苷(Cytidine)为原料,通过“一锅法”合成 CTP。“一锅法”可以有效避免反应中间体的分离纯化,减少纯化过程中的损失,提高原子经济性^[11];多酶级联催化可以减少底物转运时间,减少反应中间体的扩散,提高催化效率^[12]。通过设计优化,“一锅法”能够将廉价底物转化为高附加值产物,适用于工业化生产。

笔者以胞苷激酶(CDK)、乙酸激酶(ACK)和胞苷酸激酶(CMK)为催化剂,搭建从胞苷出发制备 CTP 的生物催化途径。在大肠杆菌 BL21 中构建 CDK 与 ACK 的共表达及融合表达菌株和 CMK 与 ACK 的融合表达菌株,建立了 CTP 生物合成反应体系并对其进行优化。

收稿日期:2023-05-11;修回日期:2024-02-04

作者简介:沈来伟(1996-),男,硕士生,研究方向为生物催化,787156353@qq.com;任宇红(1967-),男,博士,研究员,研究方向为生物催化与生物过程工程,通讯联系人,yhren@ecust.edu.cn。

1 材料与试剂

1.1 质粒与菌株

用质粒 pET28a 构建目的基因、菌株 *E. coli* DH5 α 克隆目的基因、菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 表达目的蛋白。构建 CDK、ACK 和 CMK 3 个酶的表达质粒。

1.2 主要试剂

胞苷、ATP、CMP、CDP、CTP, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司生产; 基因分子相关试剂盒, 美国 Omega 公司生产。

2 实验方法

2.1 重组菌株的构建

2.1.1 CDK 和 ACK 共表达菌株的构建

使用融合 PCR 技术将 CDK、核糖体结合基因 (RBS)、ACK 融合起来, 得到 CDK-RBS-ACK 共表达基因与 ACK-RBS-CDK 共表达基因, 将得到的目的基因与基因表达载体进行酶切、连接、转化等操作, 经测序验证后即可得到共表达菌株。

2.1.2 CDK 和 ACK、CMK 和 ACK 融合表达菌株的构建

用柔性链接 L1 (GGGGS)₂ 与刚性链接 L2 (EEEEK₂) 将 CDK 和 ACK 进行融合, 用刚性链接 L2 将 CMK 和 ACK 进行融合。将得到的目的基因与基因表达载体进行酶切、连接、转化等操作, 经测序验证后即可得到融合表达菌株。

2.2 重组蛋白的表达

重组大肠杆菌培养及诱导蛋白表达参考文献 [13]。

2.3 冻干菌粉的制备

将诱导蛋白表达后的菌体收集在 50 mL 离心管中并放入低温冰箱冷冻 (-40 $^{\circ}$ C), 待真空冷冻干燥机预冷到工作温度后, 将离心管放入干燥机中冻干 12 h, 冻干完成后取出常温放置待用。

2.4 全细胞催化合成 CTP 反应体系的建立

1 mL 反应体系: 40 mmol/L MgCl₂ · 6H₂O、125 mmol/L 胞苷、500 mmol/L 乙酰磷酸 (ACP)、20 mmol/L ATP、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液。向反应体系投加 5 mg/mL 的 CDK、CMK、ACK 冻干菌粉或 5 mg/mL 的 CDK-ACK 重组菌粉和 CMK-ACK 重组菌粉。反应温度为 37 $^{\circ}$ C, 反应 pH=7.8。反应 1 h 后取样, 用 HPLC 检测目的产物 CTP 的含量。

2.5 全细胞催化合成 CTP 反应条件探究

建立不同温度梯度和 pH 梯度的反应体系, 探究反应体系最适温度和最适 pH。在最适反应条件下分别向反应体系中加入不同金属离子溶液, 使其终浓度为 20 mmol/L, 探究不同金属离子对反应体系的影响和该金属离子最适的添加浓度。此外, 还探究 ACP、ATP 及各菌粉在反应体系中的最适添加量, 以达到最高的收率。以最高收率为 100% 来计算其他条件下的相对收率。

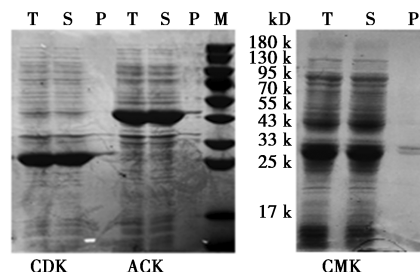
2.6 检测方法的建立

HPLC 检测条件: 液相柱为 Zorbax SB-Aq C18 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 以磷酸三乙胺水溶液 (pH 6.6) 和甲醇混合液作为流动相 (体积比为 96:4), 紫外检测器波长为 260 nm, 检测样品用量为 10 μ L, 流速为 1 mL/min。

3 结果与讨论

3.1 CDK、ACK、CMK 酶活检测

CDK、ACK、CMK 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导蛋白表达, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳验证发现 3 个酶都是可溶性表达, 如图 1 所示。



M—标准蛋白分子质量; T—全细胞; S—上清; P—沉淀

图 1 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

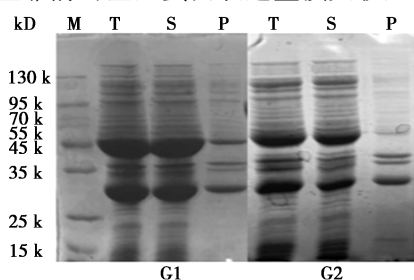
用冻干菌粉作催化剂验证重组蛋白的催化活性, 按 2.4 配置反应体系, 并投加 5 mg 的 CDK、ACK、CMK 菌粉启动反应, 结果表明: 以 CDK、ACK、CMK 为催化剂能得到目标产物 CTP。在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中构建 CDK 与 ACK 共表达及融合表达体系和 CMK 与 ACK 融合表达体系, 并验证其对催化合成 CTP 的影响。

3.2 重组菌株的构建与表达

3.2.1 共表达菌株的构建与表达

成功构建了 2 种共表达菌株: BL21-pET28a-CDK-ACK-CO (G1) 和 BL21-pET28a-ACK-CDK-CO (G2)。G1 与 G2 蛋白表达情况如图 2 所示。从图 2 中可以看出, 两者均实现可溶性表达, 并且相关

蛋白的表达量受基因序列插入位置影响,共表达时插入位置靠前的基因蛋白表达量损失较少。

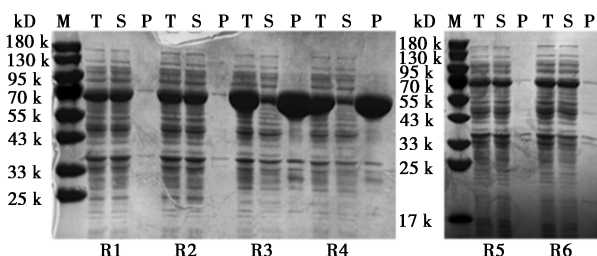


M—标准蛋白分子质量;T—全细胞;S—上清;P—沉淀

图 2 共表达蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

3.2.2 融合表达菌株的构建与表达

由于基因插入顺序和 Linker 的种类会影响融合蛋白的活性,选取柔性 Linker L1(GGGGS)₂ 和刚性 Linker L2(EEEEK₂)₂ 构建了 6 种融合菌株:CDK-L1-ACK(R1)、ACK-L1-CDK(R2)、CDK-L2-ACK(R3)、ACK-L2-CDK(R4)、CMK-L2-ACK(R5)和 ACK-L2-CMK(R6),如图 3 所示。从图 3 中可以看出,融合后蛋白胶理论值 77 kD 附近有明显的蛋白条带,刚性 Linker L2 的连接下,R3 和 R4 融合蛋白在沉淀中表达量较多,说明 Linker 的刚柔性也会影响蛋白的结构,刚性 Linker 对所构建的融合蛋白影响较大,导致了包涵体的形成。



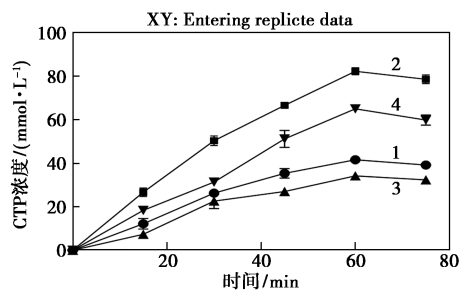
M—标准蛋白分子质量;T—全细胞;S—上清;P—沉淀

图 3 融合表达蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

3.3 全细胞催化活性比较

3.3.1 融合蛋白催化活性探究

重组蛋白中 R3 和 R4 大部分为包涵体表达,为探究其催化能力,将融合蛋白 R3、R4(50 mg/mL)菌体超声破碎后,分别取其上清和沉淀与 5 mg CMK 冻干菌粉加入反应体系进行反应,反应体系参照 2.4 中所述的方法进行配置,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,除上清有催化活性外,沉淀也具有催化活性,并且包涵体催化生成的 CTP 比上清要多,说明虽然双酶融合导致蛋白错误折叠形成包涵体,但其仍具有一定的催化活性,李彬春等^[14]在研究 α -L-鼠李糖苷酶时也有活性包涵体出现。



1—R3 上清;2—R3 沉淀;3—R4 上清;4—R4 沉淀

图 4 融合蛋白 R3、R4 细胞裂解物上清和沉淀分别催化生成 CTP 的浓度

3.3.2 重组菌全细胞催化效率

为了筛选出活性最好的重组蛋白,参照 2.4 中所述的反应体系,称取等量的冻干菌粉投入反应,用 HPLC 检测反应液中 CTP 浓度,结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出,相较于对照组(三菌混合催化,CK),重组蛋白催化效率均有提高,活性最好的为 R3 和 R5,CTP 浓度比对照组提高了 1.47 倍。这是因为共表达和融合表达策略能够缩短底物转运距离,拉近不同酶活性中心的距离产生邻近效应,使催化效率得到提高^[15-16]。

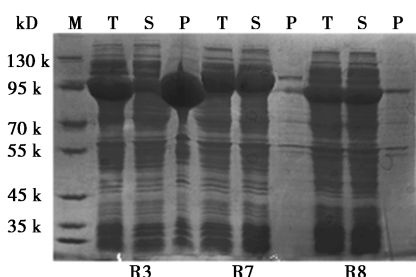
表 1 全细胞催化生产 CTP 产量

菌粉	CTP 浓度/(mmol·L ⁻¹)			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均浓度
CK	80.0	76.4	74.1	76.8
G1	112.6	106.4	110.2	109.7
G2	98.7	96.2	94.3	96.4
R1	93.7	89.6	86.8	90.0
R2	84.3	86.7	82.4	84.5
R3	112.5	109.3	109.8	110.5
R4	104.3	99.6	101.1	101.7
R5	121.3	119.2	121.7	120.7
R6	107.6	104.5	103.1	105.1

3.3.3 融合蛋白可溶性表达载体的构建

通过对比发现融合蛋白 R3 具有较好的催化潜力,但包涵体表达会影响蛋白活性,用增加 SUMO 促融标签(R7)和更换 PKV 蛋白表达载体(R8)2 个策略实现蛋白的可溶性表达,结果如图 5 所示。从图 5 中可以看出,2 种策略均成功实现可溶性表达,后续对其催化活性进行对比。将构建的 3 种菌诱导表达后制成冻干菌粉,分别称取 4 mg 冻干菌粉并按照 2.4 所述的反应体系进行催化反应,反应 1 h 后取样并通过 HPLC 检测 CMP 的浓度,结果如表 2 所

示。从表 2 中可以看出,在实现可溶性表达以后,融合蛋白催化活性得到增强,相较于包涵体表达的 R3,R7 的 CTP 浓度提高了 5%,相较于对照组(游离酶混合,CK)浓度提高了 48.4%。PKV 载体构建的 R8 较对照组的 CTP 浓度提高了 26.6%。对催化效率最高的 R5 与 R7 进行双质粒表达,并验证其催化效率,结果发现相较于分开投加体系双质粒表达菌株催化效率下降较大,因此用分别投加 R5 与 R7 的策略进行后续反应。



M—标准蛋白分子质量;T—全细胞;S—上清;P—沉淀

图 5 融合表达蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

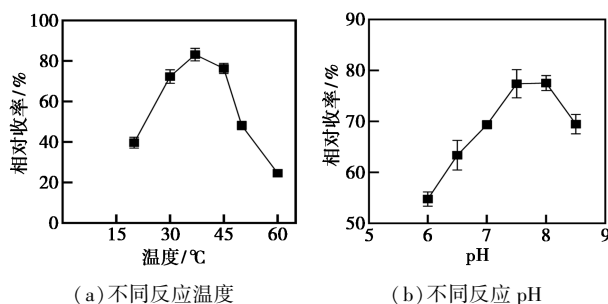
表 2 可溶性载体菌株全细胞催化生产 CTP 产量

菌粉	CTP 浓度/(mmol·L ⁻¹)			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均浓度
CK	80.0	76.4	74.1	76.8
R3	112.5	109.3	109.8	110.5
R7	112.1	114.6	115.3	114.0
R8	98.8	99.8	90.6	96.4

3.4 全细胞催化条件的优化

3.4.1 反应温度和 pH 对 CTP 合成的影响

对于多酶反应体系,不同的酶具有不同的最适温度和 pH,因此反应体系应该尽可能保证各个酶都能充分发挥他们的活性,以提高整体催化效率。温度和 pH 对催化合成 CTP 的影响如图 6 所示。从图 6(a)中可以看出,在温度较低时,CTP 收率随着温度的升高而增加,在 37℃ 时收率最高,超过 45℃ 以



(a) 不同反应温度

(b) 不同反应 pH

图 6 温度和 pH 对催化合成 CTP 的影响

后,收率显著下降,说明高温对酶活性影响较大。从图 6(b)中可以看出,随着 pH 的升高,收率逐渐提高,在 pH 为 7.8 左右时产率达到最大。

3.4.2 乙酰磷酸浓度对催化合成 CTP 的影响

在最适温度和 pH 条件下,研究了乙酰磷酸(ACP)浓度对产物收率的影响,结果如表 3 所示。从表 3 中可以看出,随着 ACP 浓度的升高,CTP 收率也在不断提高,在 ACP 浓度为 500 mmol/L 时收率达到最大,所以反应体系的最佳 ACP 浓度为 500 mmol/L。

表 3 乙酰磷酸浓度对催化合成 CTP 的影响

ACP 浓度/ (mmol·L ⁻¹)	相对收率/%			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均收率
200	42.3	39.6	45.6	42.5
300	56.7	58.4	61.2	58.8
400	69.2	70.3	68.7	69.5
500	78.4	80.4	79.6	79.5
600	72.4	70.3	68.9	70.5

3.4.3 金属离子对催化合成 CTP 的影响

在酶催化反应中,金属离子通常对酶活性具有激活或抑制作用。研究表明,Mg²⁺和 Mn²⁺对核苷酶具有一定的变构激活作用,除此之外,Zn²⁺和 Co²⁺对磷酸核糖类酶同样具有激活作用^[17-18]。因此,探究了不同金属离子对反应体系的影响,结果如表 4 所示。从表 4 中可以看出,在 20 mmol/L 的浓度下,相较于空白对照组(不添加金属离子),Zn²⁺、Ni²⁺、Mg²⁺、Co²⁺和 Mn²⁺对催化反应具有促进激活作用,效果最好的是添加 Mg²⁺,收率提高 70.4%,因此,选取 Mg²⁺作为反应体系的激活剂。为了确定 Mg²⁺最佳的添加量,对其添加浓度进行了研究,结果如表 5 所

表 4 金属离子对催化合成 CTP 的影响

金属离子	相对收率/%			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均收率
空白对照	29.6	27.7	31.9	29.7
Cu ²⁺	12.3	14.0	12.9	13.1
Zn ²⁺	39.7	40.9	42.8	41.1
Ni ²⁺	36.7	37.9	38.7	37.8
Ca ²⁺	14.9	13.1	15.7	14.6
Fe ²⁺	26.3	27.4	28.9	27.5
Mg ²⁺	54.9	56.3	55.7	55.6
Co ²⁺	48.4	49.2	48.1	48.6
Mn ²⁺	45.4	44.1	42.6	44.0

注:金属离子浓度为 20 mmol/L。

表 5 不同 Mg^{2+} 浓度对催化合成 CTP 的影响

Mg^{2+} 浓度/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	相对收率/%			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均收率
10	41.4	43.2	41.9	42.2
20	54.9	56.3	55.7	55.6
30	69.2	70.3	68.7	69.4
40	78.4	80.4	79.6	79.5
50	79.2	80.1	79.3	79.5
60	78.6	80.3	79.6	79.5

示。从表 5 中可以看出,随着 Mg^{2+} 浓度的升高,CTP 收率逐渐提升,在 40 $mmol/L$ 时最大收率提高了 90.4%,所以反应体系中 Mg^{2+} 最佳浓度为 40 $mmol/L$ 。

3.4.4 菌粉质量浓度对催化合成 CTP 的影响

菌粉质量浓度是影响终产物产量的重要因素,因此,探究了反应体系中 SUMO-CDK-L2-ACK (R7) 和 CMK-L2-ACK (R5) 质量浓度对反应体系的影响,结果如图 7 所示。从图 7(a) 中可以看出,固定 R7 菌粉质量浓度为 5 mg/mL ,随着 R5 菌粉质量浓度的增加,CTP 产量逐渐升高,R5 菌粉质量浓度为 4 mg/mL 时产量最大。从图 7(b) 中可以看出,确定 R5 菌粉质量浓度为 4 mg/mL ,随着 R7 菌粉质量浓度的增加产量逐渐增大,R7 菌粉质量浓度为 4 mg/mL 时产量达到最大,说明 R7 菌粉最佳质量浓度为 4 mg/mL 。综上所述,R5 和 R7 菌粉的最优质量浓度分别均为 4 mg/mL 。

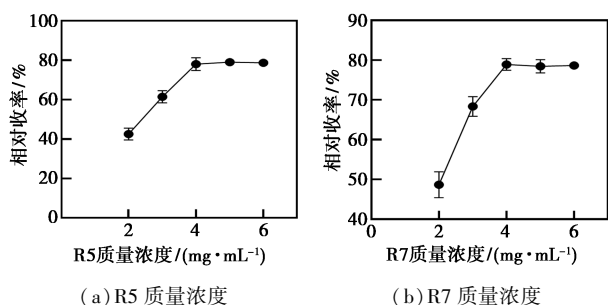


图 7 不同菌粉质量浓度对催化合成 CTP 的影响

3.4.5 ATP 浓度对催化合成 CTP 的影响

催化合成体系中需要 ATP 提供磷酸基团,因此,考察了 ATP 浓度对催化合成 CTP 的影响,结果如表 6 所示。从表 6 中可以看出,随着 ATP 浓度的提高,CTP 产率逐渐升高,ATP 浓度为 20 $mmol/L$ 时 CTP 收率达到最大;继续提高 ATP 浓度,收率不再增加,因此,ATP 的最佳浓度为 20 $mmol/L$ 。

表 6 ATP 浓度对催化合成 CTP 的影响

ATP 浓度/ ($mmol \cdot L^{-1}$)	相对收率/%			
	平行 1	平行 2	平行 3	平均收率
5	42.3	39.6	45.6	42.5
10	56.7	58.4	61.2	58.8
15	69.7	70.2	68.3	69.4
20	78.6	78.4	81.4	79.5
25	79.2	77.1	76.3	77.5
30	78.7	79.4	77.3	78.5

3.5 一锅法全细胞催化合成 CTP

在优化反应条件下,于 100 mL 的反应体系下进行催化反应,结果如图 8 所示。从图 8 中可以看出,在 0~45 min 内,反应速率较快,底物消耗超过一半,在 75 min 底物消耗完全,CTP 产量达到 108 $mmol/L$,总收率为 86.4%,实现了 CTP 的一锅法合成。

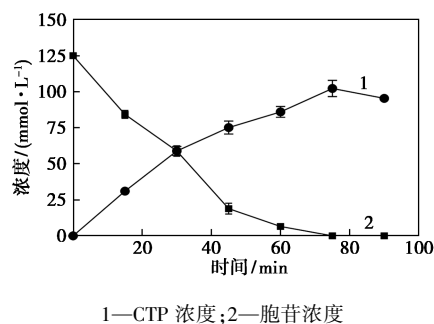


图 8 一锅法全细胞催化合成 CTP

4 结论与展望

以胞苷 (Cytidine) 为底物,用大肠杆菌对 CDK 与 ACK 进行共表达及融合表达改造和 CMK 与 ACK 进行融合表达改造,并探究其催化效率,得到催化效率最高的融合菌株 SUMO-CDK-L2-ACK 与融合菌株 CMK-L2-ACK,建立的双融合菌催化体系是三菌混合反应体系的 1.54 倍。对反应条件进行优化,优化后 CTP 产量达到 108 $mmol/L$,总收率为 86.4%,实现了 CTP 的一锅法合成。但应用于工业化生产还需解决一些问题:一是收率还有待进一步提高,采用静息细胞催化会产生一定比例的副产物,后续研究可以对产生副产物的相关基因进行敲除或其他正向改造,从而提高催化效率和收率;二是产物分离问题,CTP 的合成路线往往需要大量的 ATP 参与反应,虽然用乙酸激酶 ACK 使反应体系能够做到 ATP 的循环,减少了 ATP 的投加,但仍需要使用一定比例的 ATP,这给产物的分离纯化带来一定的

困难。后续研究可尝试建立 ATP 内循环的无细胞酵母体系,从而避免直接添加 ATP 造成的产物分离困难。

参考文献

- [1] 詹谷宇,莫晓燕,席丹.胞嘧啶核苷三磷酸生物合成研究[J].西北药学杂志,1997,(2):81-82.
- [2] 应国清,单剑峰,石陆娥,等.利用啤酒酵母生物合成胞苷三磷酸的研究[J].浙江工业大学学报,2004,(4):68-72.
- [3] Schuknecht H. Disorders of circulation [M]. Cambridge: Pathology of the ear Harvard University Press, 1974:319-330.
- [4] Kittaka M, Giannotta S L, Zelman V, et al. Attenuation of brain injury and reduction of neuron-specific enolase by nicardipine in systemic circulation following focal ischemia and reperfusion in a rat model [J]. Journal of Neurosurgery, 1997, 87(5):731-737.
- [5] Ota C Y, Kimura R S. Ultrastructural study of the human spiral ganglion [J]. Acta Otolaryngol, 1980, 89(1/2):53-62.
- [6] Parvini S, Hamann S R, Martin W R. Pharmacologic characteristics of a medullary hyperalgesic center [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1993, 265(1):286-293.
- [7] 朱军,刘清军,付爱军,等.三磷酸胞苷二钠在重型颅脑损伤中的应用[J].中国综合临床,2004,(11):68-69.
- [8] 刘杰,顾运江.啤酒酵母生物合成胞苷三磷酸的实验研究[J].山东化工,2014(7):24-27.
- [9] 赵瑞.全细胞催化胞苷磷酸化合成三磷酸胞苷的研究[D].南京:南京工业大学,2008.
- [10] Lee Sun-Gu Lee, Lee Jeong-Oh, Yi Jung-Kyu, et al. Production of cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid using recombinant *Escherichia coli* as a biocatalyst [J]. Biotechnol Bioeng, 2002, (80):516-524.
- [11] Garcia N L, Cabrera Z, Urrutia P, et al. Recent advances in enzymatic and chemoenzymatic cascade processes [J]. Catalysts, 2020, 10(11):1258-1277.
- [12] Wu S, Zhi L J C. Whole-Cell cell cascade biotransformations for one-pot multistep organic synthesis [J]. Chemcatchem, 2018, 10(10):2164-2178.
- [13] Li Z, Li F, Cai L, et al. One-pot multienzyme synthesis of rare ketoses from glycerol [J]. J Agr Food Chem, 2020, 68(5):1347-1353.
- [14] 李彬春,张甜,吉亚茹,等. α -L-鼠李糖苷酶以催化活性包涵体形式异源表达及其酶学性质[J].食品科学,2018,39(14):79-84.
- [15] Zhang Y J B A. Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(6):715-725.
- [16] Gourinchas G, Busto E, Killinger M, et al. A synthetic biology approach for the transformation of *L*- α -amino acids to the corresponding enantiopure (*R*)- or (*S*)- α -hydroxy acids [J]. Chemical Communications, 2015, 51(14):2828-2831.
- [17] Dowolf W E, Fullin F A, Schramm V L J O B C. The catalytic site of AMP nucleosidase. Substrate specificity and pH effects with AMP and formycin 5'-PO₄ [J]. J Biol Chem, 1979, 254(21):10868-10875.
- [18] Kadziola A, Jepsen C H, Johansson E, et al. Novel class III phosphoribosyl diphosphate synthase: Structure and properties of the tetrameric, phosphate-activated, non-allosterically inhibited enzyme from *Methanocaldococcus jannaschii* [J]. J Mol Biol, 2005, 354(4):815-828. ■
- [14] Pinacho D G, Sánchez-Baeza F, Marco M P. Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(10):4527-4534.
- [15] Monfort O, Usman M, Soutrel I, et al. Ferrate(VI) based chemical oxidation for the remediation of aged PCB contaminated soil: Comparison with conventional oxidants and study of limiting factors [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 355:109-117.
- [16] Yang B, Ying G G, Zhao J L, et al. Removal of selected endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) during ferrate(VI) treatment of secondary wastewater effluents [J]. Water Research, 2012, 46(7):2194-2204.
- [17] Manoli K, Maffettone R, Sharma V K, et al. Inactivation of murine norovirus and fecal coliforms by ferrate(VI) in secondary effluent wastewater [J]. Environ Sci Technol, 2020, 54:1878-1888.
- [18] Ma L, Lam W, Lo P K, et al. Ca²⁺-induced oxygen generation by FeO₄²⁻ at pH 9-10 [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2016, 55(9):3012-3016.
- [19] Zhu J, Yu F, Meng J, et al. Overlooked role of Fe(IV) and Fe(V) in organic contaminant oxidation by Fe(VI) [J]. Environ Sci Technol, 2020, 54:9702-9710.
- [20] Feng M, Wang X, Chen J, et al. Degradation of fluoroquinolone antibiotics by ferrate(VI): Effects of water constituents and oxidized products [J]. Water Res, 2016, 103:48-57.
- [21] Luo M, Zhang H, Zhou P, et al. Graphite (GP) induced activation of ferrate(VI) for degradation of micropollutants: The crucial reduction role of carbonyl groups on GP surface [J]. J Hazard Mater, 2022, 434:128827.
- [22] Yang B, Ying G. Oxidation of benzophenone-3 during water treatment with ferrate(VI) [J]. Water Res, 2013, 47:2458-2466.
- [23] Zheng Q, Wu N, Qu R, et al. Kinetics and reaction pathways for the transformation of 4-tert-butylphenol by ferrate(VI) [J]. J Hazard Mater, 2021, 401:123405.
- [24] Luo Cong, Feng Mingbao, Virender K Sharma, et al. Effect of metal ions on oxidation of micropollutants by ferrate(VI): Enhancing role of Fe(IV) species [J]. Environ Sci Technol, 2021, 55:623-633.
- [25] 邵彬彬,乔俊莲,赵志伟,等.基于高铁酸盐的水污染控制技术研究进展[J].科学通报,2019,64(33):3401-3411.
- [26] Zhang Z, Li X, Zhang C, et al. Combining ferrate(VI) with thiosulfate to oxidize chloramphenicol: Influencing factors and degradation mechanism [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2021, 9(1):104625.
- [27] 蒋家倩, Lloyd B. 高铁(VI)盐作为氧化剂和混凝剂用于水和废水处理的开发和应用进展[J].水研究,2002,36(6):1397-1408.
- [28] 丁春生,毛莎,肖毛虎,等.高铁酸钾去除饮用水中二氯乙腈 [J].浙江工业大学学报,2020,48(3):290-294. ■

(上接第 168 页)