

半理性设计D-阿洛酮糖3-差向异构酶高效合成D-阿洛酮糖

王楷喆, 马文杰, 高宇昂, 毛淑红, 田康明, 秦慧民*

(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 为了提高 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (D-allulose 3-epimerase, DAEase) 的催化活性与热稳定性, 满足其在工业生产中的应用需求, 研究通过基因挖掘结合半理性设计改造获得高性能突变体。在大肠杆菌中实现了来源于黄体微杆菌 (*Microbacterium luteolum*) MDAEase 的可溶性表达, 该酶最适催化条件为 60 °C、pH 值 8.0。通过三维结构建模分析指导半理性设计, 结合高通量筛选获得优势突变体 G65M、G65E 和 M110W。经组合突变 (CAST) 得到相对活性提高 2.41 倍的突变体 G65E/M110W, 其 k_{cat}/K_m 提高了 5.09 倍。突变体 G65E/M110W 催化 500 g·L⁻¹ D-果糖生成 153 g·L⁻¹ D-阿洛酮糖, 转化率达到 30.60%, 相较于野生型提高 2.09 倍。研究结果表明, MDAEase 是一种具有良好改造潜力的新型 DAEase, 通过结构指导的半理性设计可显著提升其催化性能和热稳定性。该研究为 D-阿洛酮糖的高效酶法制备提供了理论依据和候选酶资源, 具有良好的工业应用前景。

关键词: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; D-阿洛酮糖; 稀有糖; 饱和突变; 半理性设计

文章编号: 1673-9078(2026)06-188-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0612

Structure-guided Semi-rational Engineering of D-allulose 3-epimerase for Enhanced D-allulose Biosynthesis

WANG Kaizhe, MA Wenjie, GAO Yuang, MAO Shuhong, TIAN Kangming, QIN Huimin*

(College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To enhance the catalytic activity and thermal stability of D-allulose 3-epimerase (DAEase) for industrial applications, high-performance mutants were engineered through integrating gene mining with semi-rational design. In this study, the DAEase gene from *Microbacterium luteolum* (MDAEase) was heterologously expressed in *Escherichia coli* with soluble production, exhibiting optimal activity at 60 °C and pH 8.0. To address the poor thermal stability of MDAEase that limits industrial applications, semi-rational design was performed guided by three-dimensional structural modeling and high-throughput screening, which identified the key mutants G65M, G65E, and M110W. The combinatorial mutant G65E/M110W, constructed via the CAST strategy, exhibited a 2.41-fold increase in relative activity and a 5.09-fold enhancement in catalytic efficiency compared to the wild-type. In industrial biocatalytic processes, the engineered mutant converted 500 g·L⁻¹ D-fructose to 153 g·L⁻¹ D-allulose, achieving a conversion rate of 30.60%, which represented a 2.09-fold improvement over the wild-type enzyme. The results demonstrated MDAEase as a novel D-allulose 3-epimerase with great potential for engineering. Its catalytic performance and thermal stability

引文格式:

王楷喆, 马文杰, 高宇昂, 等. 半理性设计 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶高效合成 D-阿洛酮糖 [J]. 现代食品科技, 2026, 42(6): 188-195.

WANG Kaizhe, MA Wenjie, GAO Yuang, et al. Structure-guided semi-rational engineering of D-allulose 3-epimerase for enhanced D-allulose biosynthesis [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 188-195.

收稿日期: 2025-04-30; 修回日期: 2025-06-17; 接受日期: 2025-06-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2104901); 国家自然科学基金项目 (32372279); 天津科技大学大学生创新创业训练计划项目 (202410057166)

作者简介: 王楷喆 (2004-), 男, 本科生, 研究方向: 生物工程, E-mail: 1316604530@qq.com

通讯作者: 秦慧民 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶制剂的改造, E-mail: huiminqin@tust.edu.cn

were significantly improved through structure-guided semi-rational design. This study provides both a theoretical basis and a candidate biocatalyst for the efficient enzymatic production of D-allulose, offering promising prospects for industrial application.

Key words: D-allulose 3-epimerase; D-allulose; rare sugar; saturation mutagenesis; semi-rational design

D-阿洛酮糖是一种低热量的天然稀有糖,其甜度是蔗糖的70%,而热量却很低^[1-3]。自然界中,D-阿洛酮糖微量存在于小麦和甘蔗、无花果中。糖果和果酱加热过程中可能发生异构反应,产生微量D-阿洛酮糖^[4]。其溶解度较高,在食品工业中展现出广阔的应用潜力^[5],研究发现D-阿洛酮糖可以抑制美拉德反应中副产物的生成,改善食品色泽^[6],增强食品凝胶的持水能力^[7],优化食品质构特性并丰富其口感^[8,9],延长食品保质期^[10]。其功能在多个领域已经得到验证,在水产品加工方面,Ogawa等^[11]发现D-阿洛酮糖可显著改善鱼糜凝胶性能,其可以快速提升热诱导鱼糜凝胶的强度和含水率。在烘焙工业中,Bolger等^[12]发现D-阿洛酮糖面糊在烘焙蛋糕过程中表现出更稳定的物性,其体积膨胀率减少42%,且其色泽更佳。此外,D-阿洛酮糖在医疗保健方面具有抗癌^[13]、抗氧化^[14]、抗骨质疏松^[15]、抗炎^[16]、抗高血压^[17]、保护神经^[18]、增强免疫力^[19]、降血糖血脂^[20]等功能,具有广阔的应用前景。近年来,人们对健康问题越来越重视,并且为积极响应国家“体重管理年”三年行动,D-阿洛酮糖依然是当下研究的最热门的稀有糖之一。

酶法合成D-阿洛酮糖具有绿色、温和并且易分离的特点,成为当前工业生产中最有前景的合成方法^[5,21]。D-阿洛酮糖可由D-阿洛酮糖3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DAEase)异构化D-果糖合成,仅需要一步反应,且副产物生成较少^[22,23]。目前,来源于*Agrobacterium tumefaciens*^[24]、*Dorea sp.*^[25]、*Sinorhizobium fredii*^[26]等DAEase已被发掘并表征,证实了生物酶法合成D-阿洛酮糖的可行性。但酶法合成D-阿洛酮糖也存在一定局限性,DAEase的稳定性较差以及活性较低^[27],限制了其在工业化生产的进一步应用。计算机辅助异构酶的工程化改造,并结合高通量筛选技术,是获得高性能突变体酶的有效手段。Qi等^[28]通过计算机辅助对来自*Thermogutta terrifontis*的*TiDAEase*进行底物口袋重塑,使其催化活性提高了5.12倍,Li等^[29]通过表面电荷工程和随机诱变结合高通量筛选获得了酸性条件下活性显著提高的突变体。DAEase家族酶普遍呈现中性最适pH值(6.0~8.0)与嗜热催化特性(最适温度40~70℃)。为了实现D-阿洛酮糖的快速生产和分离,工业生产温度普遍较高,但长时间高温环境会导致酶结构不稳定甚至变性失活,并发生褐变反应,影响产物纯度和感官品质。因此,

提升DAEase的热稳定性与催化活性是推动其在工业发展的重要措施。

本研究通过BLAST工具在NCBI酶基因库中获得来源于黄体微杆菌(*Microbacterium luteolum*)的*MiDAEase*,利用SWISS-MODEL在线工具预测*MiDAEase*的蛋白质空间结构,使用Pymol软件对其进行可视化处理。根据其空间构象分析指导半理性设计构建突变体文库,基于高通量快速筛选法^[26]筛选出最佳突变体,验证其催化高浓度D-果糖合成D-阿洛酮糖的性能,探究其在工业应用上的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

对来源于黄体微杆菌(*Microbacterium luteolum*)的基因DAEase(*MiDAEase*, GenBank登录号为WP_282215800.1)进行密码子优化并由苏州安升达生物科技有限公司合成,载体为pET28a。用于质粒扩增提取的底盘菌株*E. coli* JM109以及用于基因表达的底盘菌株*E. coli* BL21(DE3)由实验室保藏。来源于*Klebsiella pneumoniae*的NADH依赖型核糖醇脱氢酶(*KpRDH*)由实验室提供。

1.2 重组蛋白*MiDAEase*的表达与纯化

将合成的基因转化至底盘菌株*E. coli* JM109基因扩增,然后将重组质粒转化至基因表达底盘菌株*E. coli* BL21(DE3),进行目的蛋白异源表达。将pET28a-*MiDAEase*单克隆菌落挑至含有50 μg·mL⁻¹硫酸卡那霉素的5 mL LB试管中37℃、220 r·min⁻¹培养6~8 h,然后转接至含有50 μg·mL⁻¹硫酸卡那霉素的200 mL LB摇瓶中扩大培养,37℃、220 r·min⁻¹培养至对数期,加入终浓度为0.5 mmol·L⁻¹异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),16℃低温持续培养16 h,诱导异源蛋白表达。4 000 r·min⁻¹,4℃下离心15 min收集菌体保存,用于后续纯化。

将所收集菌体用Lysis Buffer(20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 20 mmol·L⁻¹ 咪唑, 500 mmol·L⁻¹ NaCl)重悬,并添加溶菌酶和PMSF,磁力搅拌15 min后进行超声破碎,超声时间开2 s,关4 s,超声功率为180 W,持续10 min。将所得破碎液12 000 r·min⁻¹ 4℃离心30 min,得到粗酶液与Ni-NTA Superflow树脂结合40 min,转入重力柱。

用 Lysis Buffer (20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 20 mmol·L⁻¹ 咪唑, 500 mmol·L⁻¹ NaCl) 洗脱杂蛋白, 然后用 Elution Buffer (20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 500 mmol·L⁻¹ 咪唑, 500 mmol·L⁻¹ NaCl) 洗脱 *MIDAEase*。用 PBS 置换后得到目标蛋白并储存于 4 °C 备用。

1.3 *MIDAEase*酶学性质表征

使用 HPLC 对 D-果糖和 D-阿洛酮糖进行定量分析, HPLC 检测条件为:

色谱仪: Agilent 1260; 检测器: 蒸发光散射检测器 (Alltech Chrom, ELSD6000); 进样: Agilent 自动进样器; 进样量 10 μL; 色谱柱: Alltech Prevail™ Carbohydrate ES (5 μm, 4.6×250 mm, Grace, America); 柱温 40 °C; 流动相: 乙腈:水=7:3; 流速 1.2 mL·min⁻¹。

MIDAEase 酶活测定: 以 10 g·L⁻¹ D-果糖为底物, 加入 1 mmol·L⁻¹ Mg²⁺、1 μmol·L⁻¹ *MIDAEase* 酶液, 置于 60 °C 水浴锅中反应 20 min, 反应结束煮沸 10 min, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 吸取上清待测。

在 40~70 °C 条件下探究 *MIDAEase* 的最适温度; 在 pH 值 5.0~10.0 条件下进行最适 pH 值的探究, 均以测定的酶活作为指标。酶在最适条件下的活性定义为 100%。

MIDAEase 的热稳定性测试按如下步骤进行: 将目标酶置于 40~70 °C (间隔 10 °C) 条件下孵育 6 h, 间隔 1 h 按上述酶活测定方法测定其相对活性。其中, 未经孵育的 *MIDAEase* 初始活性被定义为 100%。

MIDAEase 的 pH 值耐受性测试按如下步骤进行: 将目标酶在 pH 值 5.0~10.0(间隔 1.0) 条件下孵育 6 h, 间隔 1 h 按上述酶活测定方法测定其相对活性。其中, 未经孵育的 *MIDAEase* 初始活性被定义为 100%。

1.4 不同金属离子对酶活性的影响

为探究 *MIDAEase* 的最适金属离子, 向催化体系中分别添加 1 mmol·L⁻¹ 的 Mg²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ 进行催化反应, 反应方法和上述酶活测定方法一致, 终止反应后使用 HPLC 检测酶活。以水代替金属离子为对照组, 对照组相对酶活定义为 100%。

最适离子浓度测定在 *MIDAEase* 最适温度和 pH 值下, 在 0.25~1.50 mmol·L⁻¹ (间隔 0.25 mmol·L⁻¹) Mg²⁺ 浓度下测定相对活性, 酶在最适条件下的活性定义为 100%。

1.5 突变体的筛选

将 *MIDAEase* 在 SWISS-MODEL 进行同源建模, 利用 AutoDock 对 *MIDAEase* 与 D-果糖进行分子对接,

虚拟丙氨酸扫描根据底物结合自由能变化根据预测突变位点。突变后自由能变化小于 0 kcal·mol⁻¹ 的单点突变可能会提高蛋白的热稳定性, 最后通过 Pymol 对突变位点结构进行可视化和结构分析。

1.6 *MIDAEase*的饱和突变

对筛选到的突变体位点进行饱和突变, 以 pET28a-*MIDAEase* 质粒为模板, 利用 KOD-plus 试剂盒进行饱和突变, PCR 引物设计如表 1。PCR 扩增结束后加入 *Dpn* I 进行消化处理消除模板, 消化产物使用 T4 连接酶环化。将环化产物转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 获得 *MIDAEase* 饱和突变体文库。

表 1 突变体所用引物设计
Table 1 Primers used for the mutant construction

引物名称	引物序列 (5'→3')
S63-F	NNKCTGGGTCTGAGTGAAGCG
S63-R	CGCACTAACCGCCAGCG
G65-F	NNKCTGAGTGAAGCGACCG
G65-R	CAGACTCGCACTAACCGCC
G104-F	NNKGTGATCTACAGCGCG
G104-R	ACAGAAGTGTTCCGCCCG
M110-F	NNKAAAAAGTACATGGAGCCGGTG
M110-R	CGCGCTGTAGATCACGCC
H177-F	NNKCTGGACACCTACCACATG
H177-R	GATGCCCCAGTTCGG
R211-F	NNKGGTTACCTGGGTACCG
R211-R	GAAACTTTCACCGATGTGCAC

1.7 高通量筛选*MIDAEase*优势突变体

MIDAEase 的高通量筛选主要包括以下几部分。

反应: 将野生型 (WT) 和突变体阳性转化子分别挑取至含有 1 mL LB 的 48 孔板中, 37 °C 培养 12 h, 加入 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导, 16 °C 过夜培养, 将 48 孔板 4 000 r·min⁻¹ 15 min 离心收集菌体, 弃上清并用 1 mL PBS 重悬菌体, 低温环境下加入 10 g·L⁻¹ 果糖以及 1 mmol·L⁻¹ Mg²⁺, 60 °C 反应 1 h 催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖, 煮沸 10 min 终止反应。

检测: 取 2 μL 反应液体加入 2 μmol·L⁻¹ *Kp*RDH 以及 2 mmol·L⁻¹ NADH, 加入 NADH 同时开始计时, 测量 0 min 和 2 min 之间样品在 340 nm 下吸光度的差值, 与 WT 进行对比, 差值大于 WT 即酶的活性高于 WT, 从而筛选出 *MIDAEase* 优势突变体^[26]。

复筛: 将检测结果较好的转化子进行三次重复筛选, 以减少误差, 进一步确定最佳突变体。

1.8 MIDAEase动力学参数的测定

测定 MIDAEase 的动力学参数, 以 0~500 mmol·L⁻¹ D-果糖为底物, 加入 5 μmol·L⁻¹ 酶液、1 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 以及 PBS (pH 值 8.0) 缓冲液, 在 60 °C 下反应 10 min, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件中非线性回归拟合到 Michaelis-Menten 方程计算米氏常数 (K_m)、催化转换数 (k_{cat}) 以及催化效率 (k_{cat}/K_m)。

1.9 D-阿洛酮糖的合成

为了验证 MIDAEase 及其突变体催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的能力, 在 10 mL 反应体系中加入 20 μmol·L⁻¹ 酶液、500 g·L⁻¹ D-果糖、1 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 以及 PBS 缓冲液 (pH 值 8.0), 在 60 °C 条件下催化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖。每间隔 1 h 取样并通过 HPLC 测定转化率, D-阿洛酮糖产量达到稳定后终止反应。转化率计算公式如下:

$$\alpha = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

式中:
 α ——转化率, %;
 m_1 ——生成的 D-阿洛酮糖质量, g;
 m_2 ——底物中果糖质量, g。

1.10 数据分析

数据测定实验均进行了 3 次重复, 采用 Origin 2024 进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 MIDAEase的序列分析及3D模型分析

多序列比对 MIDAEase 与 DAEase 分析其序列同源性及保守性氨基酸, 结果如图 1 所示。MIDAEase 与其他 DAEase 氨基酸序列相似性为 30% 左右, 如 *Clostridium cellulolyticum* H10 DAEase^[30](27.53%)、*Dorea* sp. CaG317 DAEase^[25](26.92%)、*S. fredii* CCBAU 83666 DAEase^[26](31.41%)。结果表明, 活性中心的关键残基 E146、D179、H205 和 E240 高度保守, 催化机理与 DAEase 家族成员相似, 可能具有催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的能力。

以 Ketose 3-epimerase (PDB ID : 5ZFS) 为模板利用 SWISS-MODEL 建立 MIDAEase 的三维立体结构, 并通过 Pymol 对其结构可视化。结构分析表明, MIDAEase 由 8 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠组成, 通过与已解析的 DAEase 结构对比, 其具有 DAEase 典型的 TIM-barrel (β/α)₈ 结构域 (图 2a)。利用 AutoDock 对 MIDAEase 与 D-果糖对接, D-果糖分子周围活性位

点保守性残基 E146、D179、H205 和 E240 与金属离子 Mg²⁺ 可形成催化四分体, 表明 MIDAEase 可以与 D-果糖结合, 并催化其发生反应 (图 2b)。

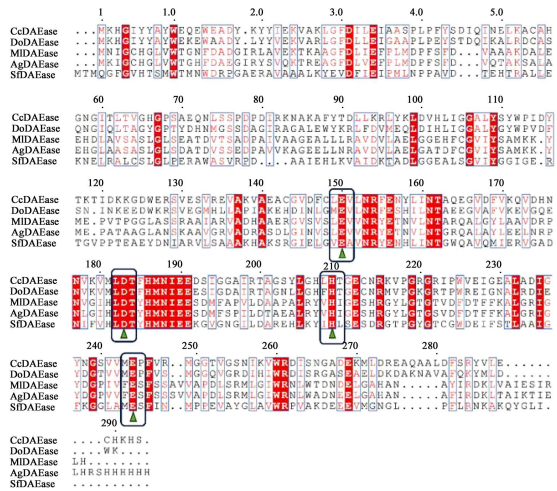


图 1 MIDAEase 多序列比对

Fig.1 Multiple sequence comparison of MIDAEase

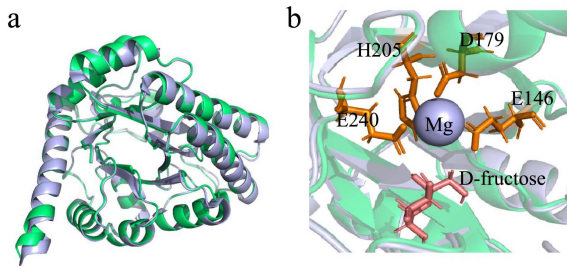


图 2 MIDAEase 的分子模型展示

Fig.2 Molecular model representation of MIDAEase

注: a: MIDAEase (紫色) 与 5ZFS (绿色) 模型拟合; b: MIDAEase 催化活性口袋分析。

2.2 MIDAEase的纯化

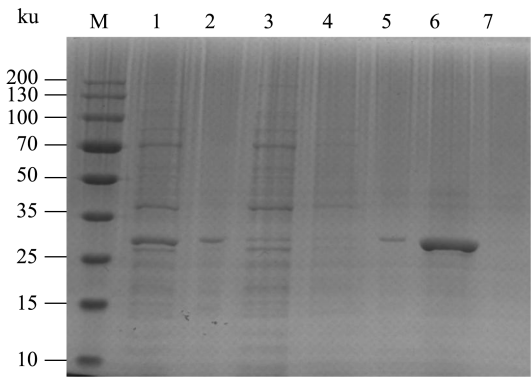


图 3 重组 MIDAEase 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE electrophoretic analysis of recombinant

MIDAEase

注: M: 180 ku Maker; 1: 粗酶液; 2: 细胞破碎液沉淀; 3: 流穿液; 4: 未结合的杂蛋白; 5: 洗脱前样品; 6: MIDAEase 酶液; 7: 洗脱后样品。

将 *MIDAEase* 基因于 *E. coli* BL21 (DE3) 异源表达,并在 16 °C 条件下经 IPTG 诱导后获得。菌体收集后采用 180 W 超声功率在冰浴条件下间歇破碎充分裂解细胞。离心所得上清液通过镍柱亲和层析纯化蛋白。SDS-PAGE 电泳结果如图 3,泳道 ~8 中 31 ku 附近显示清晰单条带,该条带分子量与 *MIDAEase* 理论值吻合,表明目标蛋白实现可溶性表达。该泳道几乎无杂带,蛋白纯度大于 90%,为后续研究提供可靠的基础。

2.3 最适温度以及热稳定性

为探究 *MIDAEase* 的最适反应温度,测定了其随温度变化的相对酶活。*MIDAEase* 在 40~70 °C 下均呈现出 50% 以上的相对活性,60 °C 时达到最高(图 4a)。热稳定性是决定其工业适用性的关键指标,进一步测定显示 *MIDAEase* 在 60 °C 下酶活呈衰减趋势,孵育 6 h 后残余活性不足 15%,而 70 °C 条件下,短时间内酶活完全丧失(图 4b)。综上,*MIDAEase* 的最适反应温度为 60 °C,与 DAEase 家族酶成员最适温度相同,但在此温度下稳定性差,需要进一步提高以满足实际应用。

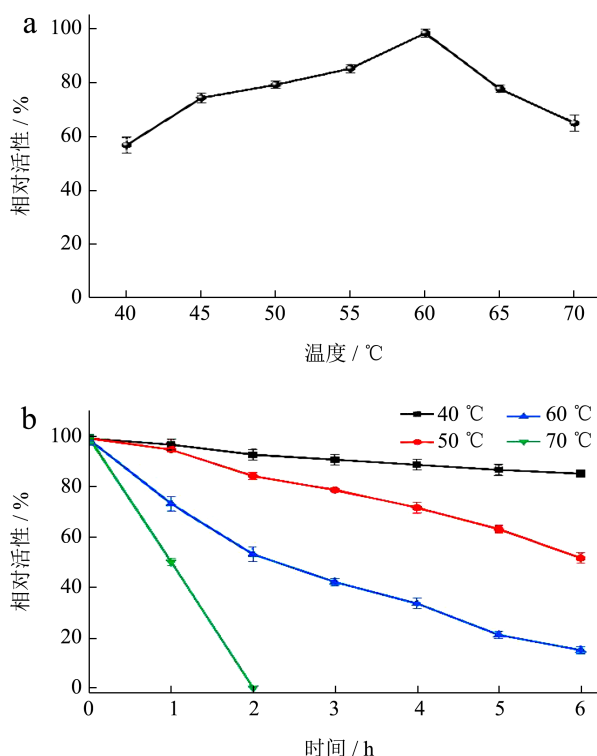


图 4 *MIDAEase* 最适温度及热稳定性测定

Fig.4 Determination of the optimal temperature and thermal stability of *MIDAEase*

注: (a) *MIDAEase* 最适温度; (b) *MIDAEase* 热稳定性。

2.4 最适 pH 值以及 pH 值耐受性

pH 值梯度实验表明, *MIDAEase* 在 pH 值 6.0~10.0

范围内维持了 60% 以上相对活性, pH 值 8.0 时呈现最高相对活性(图 5a)。pH 值耐受性探究结果表明,酸性条件下 *MIDAEase* 活性损失迅速, 3 h 便完全失活(pH 值 5.0);但在碱性环境下(pH 值 7.0~9.0)孵育 *MIDAEase* 6 h 后仍能保留 70% 以上残余活性(图 5b)。相比于其他 DAEase 家族酶,如 *DoDAEase* 的最适 pH 值为 6.0^[25], *SyDAEase* 的最适 pH 值为 7.0^[26], *MIDAEase* 最适反应 pH 值为 8.0,在碱性条件下具有稳定的催化能力。

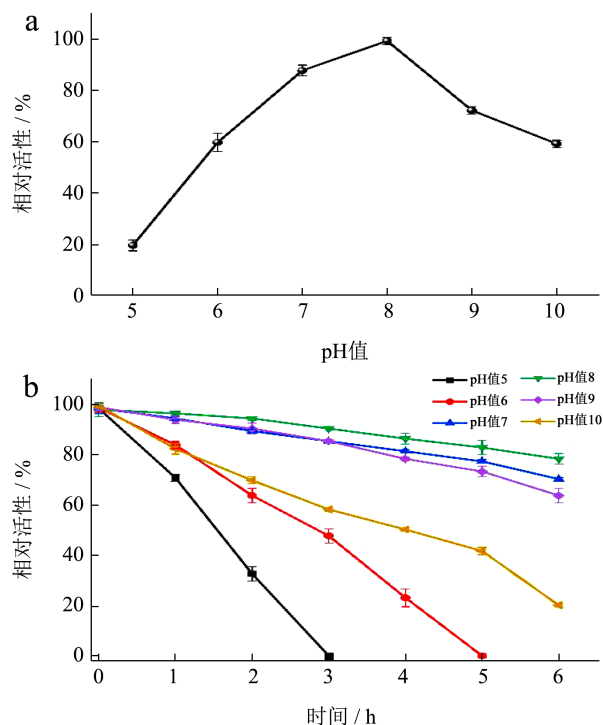


图 5 *MIDAEase* 最适 pH 值及 pH 值耐受性测定

Fig.5 Determination of the optimal pH and pH stability of *MIDAEase*

注: (a) *MIDAEase* 最适 pH 值; (b) *MIDAEase* pH 值耐受性。

2.5 *MIDAEase* 最适金属离子

DAEase 是金属依赖性酶,不同金属离子对 *MIDAEase* 酶活力影响不同,如 *AgDAEase* 在 Mn^{2+} 作用下表现出最大活性^[24],而 *DoDAEase* 在 Co^{2+} 作用下表现出最大活性^[25]。因此我们探究了 *MIDAEase* 的最适金属离子,结果表明, Mg^{2+} 和 Co^{2+} 均可以显著提高 *MIDAEase* 活性,分别提高 81.52% 和 82.58%,其他离子对酶活性影响很小(表 2)。 Mg^{2+} 和 Co^{2+} 可以稳定酶的构象,增强与底物的结合从而增其酶的活性。但过量的 Co^{2+} 不符合国际食品安全标准,故选择 Mg^{2+} 进行后续实验。进一步对 Mg^{2+} 的最适浓度进行探究,结果表明 *MIDAEase* 的最适 Mg^{2+} 浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 6)。

表 2 金属离子对酶活性的影响

Table 2 The impact of metal ions on enzyme activity

金属离子	相对酶活 / %
control	100 ± 3.12
Mg ²⁺	181.52 ± 2.15
Co ²⁺	182.58 ± 1.87
Ca ²⁺	103.31 ± 0.91
Zn ²⁺	102.16 ± 1.02
Mn ²⁺	121.27 ± 1.68

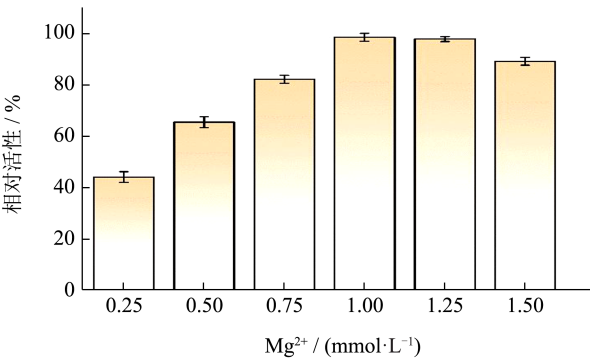


图 6 MDAEase 最适离子浓度

Fig.6 Optimal ion concentration of MDAEase

2.6 高通量筛选MDAEase突变体

利用虚拟丙氨酸扫描选取底物结合能最低的 6 个氨基酸位点 (S63、G65、G104、M110、H177、R211) 作为潜在位点进行饱和突变 (图 7a)，以 NNK

简并密码子策略构建饱和和突变体文库，结合高通量快速筛选方法以 WT (MDAEase) 为对照^[26]，通过 48 孔板快速检测突变体文库中优势突变体 (图 7b)。

表 3 MDAEase及其突变体的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of MDAEase and G65E/M110W

MDAEase	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/(mmol \cdot L^{-1})$	$k_{cat}/K_m/(L \cdot mmol^{-1} \cdot s^{-1})$
WT	56.90 ± 5.71	52.60 ± 7.93	1.08 ± 0.16
G65E/M110W	148.50 ± 14.94	27.00 ± 4.15	5.5 ± 0.83

基于 NADH 偶联的高通量筛选方式筛选了 100 个转化子，选择 Δ340 nm 排序前 10 的突变体利用 HPLC 验证活性。筛选出了 3 个优势突变体，活性分别为 G65M (171.45%)、G65E (116.52%)、M110W (118.16%) (图 7c)。利用组合突变 (CAST) 获得了优势突变体 G65M/M110W 和 G65E/M110W。突变体 G65M/M110W 的相对活性约为 132.67%，而突变体 G65E/M110W 的相对活性约为 241.36%，催化性能显著提升 (图 7d)。同时，突变体 G65E/M110W 在 60 °C 下孵育 6 h 残余活性约为 70%，较 WT MDAEase 的 15% 提高了 4.66 倍，热稳定性得到了大幅提高 (图 7e)。最后，MDAEase 和 G65E/M110W 的动力学参数表明，G65E/M110W 的 k_{cat}/K_m 值是 WT 的 5.09 倍 (表 3)，高于同家族的 TtDAEase P105A/L14C (3.55 L·mmol⁻¹·s⁻¹)^[28]、SfDAEase (0.93 L·mmol⁻¹·s⁻¹)^[26]，进一步验证突变体催化性能的显著提升。

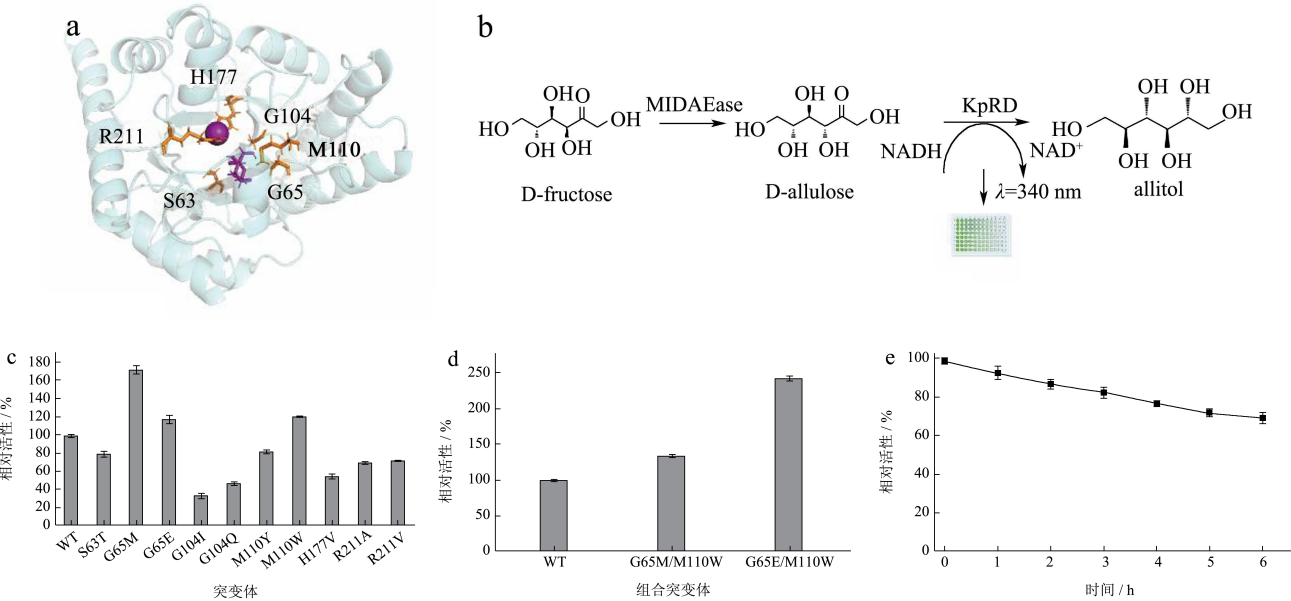


图 7 MDAEase 突变体的筛选

Fig.7 Screening for MDAEase mutants

注：a：丙氨酸扫描潜在突变体展示；b：NADH 偶联的高通量筛选方法示意图；c：MDAEase 单突变体相对活性测定；d：组合突变体相对活性测定；e：G65E/M110W 热稳定性测定。

2.7 *M*/DAEase及其突变体催化D-果糖生成D-阿洛酮糖

利用 *M*/DAEase (WT) 和突变体 G65E/M110W 在 60 °C 条件下催化 500 g·L⁻¹ D-果糖, 对比其催化性能。WT 反应 8 h 仅生成 73 g·L⁻¹ D-阿洛酮糖, 不利于工业应用; 而 G65E/M110W 生成 153 g·L⁻¹ D-阿洛酮糖, 最终转化率约 30.60% (图 8)。与已经报道 DAEase 的酶促反应转化率水平一致, 如 *Dorea* sp. CaG317 DAEase^[25] (转化率约 29.6%)、*S. fredii* CCBAU 83666 DAEase^[26] (转化率约 32%)。G65E/M110W 展现出其工业应用潜力, 可进一步开发为工业生物催化剂。

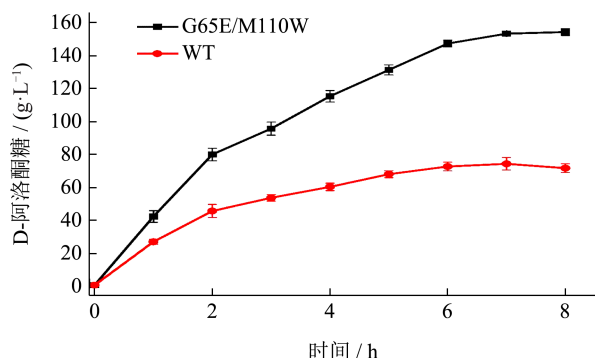


图 8 *M*/DAEase 及其突变体生产 D-阿洛酮糖

Fig.8 Production of D-allulose by *M*/DAEase and G65E/M110W mutant

3 结论

本研究发现一种新型 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 *M*/DAEase, 其最适催化条件为 60 °C、pH 值 8.0, 该酶活性和热稳定性较差, 不利于工业生产应用。针对该问题, 通过半理性设计, 筛选获得了高性能组合突变体 G65E/M110W。该突变体催化活性达到野生型的 2.41 倍, 在 60 °C 下孵育 6 h 热稳定性提高了 4.66 倍, k_{cat}/K_m 提高了 5.09 倍, 催化性能得到显著提升。最后, G65E/M110W 催化 500 g·L⁻¹ D-果糖生成了 153 g·L⁻¹ D-阿洛酮糖, 转化率达到 30.60%。本研究通过酶改造提高了 *M*/DAEase 的活性以及热稳定性, 为基于结构分析的酶分子改造提供了可行案例, 同时为工业级 D-阿洛酮糖生产开发了具有应用潜力的生物催化剂。

参考文献

[1] MATSUO T, SUZUKI H, HASHIGUCHI M, et al. D-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats [J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2002, 48(1): 77-80.

[2] MOORADIAN A D. In search for an alternative to sugar to reduce obesity [J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2019, 89(3-4): 113-117.

[3] WENLI Z, DING C, JIAJUN C, et al. D-allulose, a versatile rare sugar: recent biotechnological advances and challenges [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5661-5679.

[4] OSHIMA H, KIMURA I, IZUMORI K. Psicose contents in various food products and its origin [J]. Food Science and Technology Research, 2006, 12(2): 137-143.

[5] BERNAERTS M J, FURNELLE J, LEY J D. The preparation of some new disaccharides and D-allose from 3-ketoglycosides [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1963, 69: 322-330.

[6] SAHAR K, MARYAM G, GHODRATOLLAH P, et al. D-allose: molecular pathways and therapeutic capacity in cancer [J]. Current Molecular Pharmacology, 2023, 16(8): 801-810.

[7] O'CHAROEN S, HAYAKAWA S, OGAWA M. Food properties of egg white protein modified by rare ketohexoses through maillard reaction [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(1): 194-202.

[8] OSHIMA H, KIMURA I, KITAKUBO Y, et al. Factors affecting psicose formation in food products during cooking [J]. Food Science and Technology Research, 2014, 20(2): 423-430.

[9] MASAHIRO O, MASAKI I, SHIGERU H, et al. Effects of rare sugar D-allulose on heat-induced gelation of surimi prepared from marine fish [J]. Journal of The Science of Food and Agriculture, 2017, 97(14): 5014-5020.

[10] YUANXIA S, SHIGERU H, MASAHIRO O, et al. Evaluation of the site specific protein glycation and antioxidant capacity of rare sugar-protein/peptide conjugates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(26): 10205-10212.

[11] OGAWA M, INOUE M, HAYAKAWA S, et al. Effects of rare sugar D-allulose on heat-induced gelation of surimi prepared from marine fish [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2017, 97(14): 5014-5020.

[12] BOLGER A M, RASTALL R A, ORUNA-CONCHA M J, et al. Effect of D-allulose, in comparison to sucrose and D-fructose, on the physical properties of cupcakes [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 150: 111989.

[13] SUN Y, HAYAKAWA S, OGAWA M, et al. Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D -psicose [J]. Food Control, 2005, 18(3): 220-227.

[14] JIHUI J, RUIXING H, PING Z. D-allose alleviates ischemia/reperfusion (I/R) injury in skin flap via MKP-1 [J]. Molecular Medicine Cambridge, Mass, 2020, 26(1): 21.

[15] SHINTANI T, YANAI S, KANASAKI A, et al. Long-term D-allose administration ameliorates age-related cognitive impairment and loss of bone strength in male mice [J]. Experimental Gerontology, 2024, 196: 112555.

[16] HUANG T, GAO D, HEI Y, et al. D-allose protects the blood brain barrier through PPARγ-mediated anti-inflammatory pathway in the mice model of ischemia reperfusion injury [J]. Brain Research, 2016, 1642: 478-486.

[17] AKUMWAMI S, RAHMAN A, FUNAMOTO M, et al. Effects of D-allose on experimental cardiac hypertrophy [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2024, 156(2): 142-148.

[18] YAO WEN L, JUNKAI C, YIHAO F, et al. D-allose inhibits TLR4/

- PI3K/AKT signaling to attenuate neuroinflammation and neuronal apoptosis by inhibiting Gal-3 following ischemic stroke [J]. Biological Procedures Online, 2023, 25(1): 30.
- [19] WANMENG M, M H H A, LEON Z, et al. Chemistry behind rare wugars and bioprocessing [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(51): 13343-13345.
- [20] WENLI Z, YANMIN Z, JIAWEI H, et al. Thermostability improvement of the D-allulose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 by site-directed mutagenesis at the interface regions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(22): 5593-5601.
- [21] PHELPS F P, BATES F. Preparation of crystalline β -D-allose [J]. Journal of the American Chemical Society, 1934, 56(5): 1005-1256.
- [22] ITOH H, HIROAKI O, RAHMAN K A, et al. Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1994, 58(12): 2168-2171.
- [23] IZUMORI K, KHAN RAHMAN A, OKAYA H, et al. A new enzyme, D-ketohexose 3-epimerase, from *Pseudomonas* sp. st-24 [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1993, 57(6): 1037-1039.
- [24] HYE-JUNG K, EUN-KYUNG H, YEONG-SU K, et al. Characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 981-985.
- [25] ZHANG W, LI H, ZHANG T, et al. Characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 with an acidic pH optimum and a high specific activity [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 120: 68-74.
- [26] CHAO L, WEI Z, CANCAN W, et al. Continuous spectrophotometric assay for high-throughput screening of predominant D-allulose 3-epimerases [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(39): 11637-11645.
- [27] ZHANGLIANG Z, LEI L, WEI Z, et al. Improving the enzyme property of D-allulose 3-epimerase from a thermophilic organism of *Halanaerobium congolense* through rational design [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2021, 149: 109850.
- [28] HONGBIN Q, TONG W, HUIMIN L, et al. Sequence- and structure-based mining of thermostable D-allulose 3-epimerase and computer-guided protein engineering to improve enzyme activity [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(74): 18431-18442.
- [29] LEI L, QIANQIAN Z, TONG W, et al. Engineering of acid-resistant D-allulose 3-epimerase for functional juice production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(51): 16298-16306.
- [30] MU W, CHU F, XING Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *clostridium cellulolyticum* H10 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7785-7792.