基于祖先序列重建的耐酸DAEase改造及应用

赵广飞[1,2]，董娅[1]，梁硕[1]，李佳运[1]，蒋宜勋[1]，田康明[1]，吴泽华[1,3*]，秦慧民[1]

（1.天津科技大学生物工程学院,天津 300457）（2.山东祥瑞药业有限公司,山东泰安 271509）

（3.山东寿光巨能金玉米开发有限公司，山东寿光 261000）

摘要：D-阿洛酮糖作为一种新型功能性甜味剂，可通过D-阿洛酮糖3-差向异构酶（D-allulose 3-epimerase, DAEase）催化合成，但多数DAEase的耐酸性较差限制了其工业应用。为了提高DAEase的催化活性与耐酸性，适应果汁加工中常见的酸性环境。本研究采用系统发育指导的大数据挖掘和祖先序列重建策略（ASR）开发了新型DAEase (A3)。结果显示，祖先酶A3在pH值4.0~7.0范围内的相对活性均高于70%；在pH值4.0条件下孵育6 h后仍保留37.51%的残余活性（提高10.09倍），表明其具有良好的催化活性和耐酸性。分子动力学模拟与结构分析表明，更多的氢键、β4-α4环刚性和活性位点隧道入口的收缩联合抵抗了酸性环境。最后，祖先酶A3成功催化了果汁体系中高热量糖向D-阿洛酮糖的原位转化，转化率均达到30%以上。研究结果表明,祖先酶A3是一种具有良好应用潜力的新型DAEase兼具催化性能与稳定性。综上，本研究提出了一种具有应用潜力的DAEase耐酸性改造策略，并为富含D-阿洛酮糖的功能性食品工业化生产提供了高效稳定的生物催化剂支撑。

关键词：祖先序列重建；D-阿洛酮糖；D-阿洛酮糖3差向异构酶；耐酸性；功能性果汁

文章编号：1673-9078(2026)10-1-9 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.10.0292

Modification and Application of Acid-resistant DAEase Based on Ancestral Sequence Reconstruction

ZHAO Guangfei[1,2], DONG Ya[1], LIANG Shuo[1], LI Jiayun[1], JIANG Yixun[1], TIAN Kangming[1], WU Zehua[1,3*], QIN Huimin[1*]

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

(2.Shandong Xiangrui Pharmaceutical Co. Ltd., Tai'an 271509, China)

(3.Shandong Shouguang Juneng Golden Corn Co. Ltd., Shouguang 261000, China)

Abstract: D-allulose, a rare sugar and functional sweetener, can be biosynthesized by D-allulose 3-epimerase (DAEase). However, the limited acid tolerance of the majority of reported DAEases severely limits their application. To develop a DAEase with enhanced catalytic activity and acid resistance for use under acidic conditions commonly encountered during juice processing, a phylogenetics-guided big-data mining and ancestral sequence reconstruction (ASR) strategy was employed to construct a novel DAEase (A3). Enzymatic characterization showed that the ancestral enzyme A3 retained more than 70% relative activity over a pH range of 4.0~7.0. After incubation at pH 4.0 for 6 h, A3 still retained 37.51% residual activity (10.09-fold higher than CcDAE), demonstrating enhanced catalytic performance and acid tolerance. Molecular dynamics simulation and structural analysis indicate that the presence of more hydrogen bonds, β4-α4 ring rigidity, and contraction of active-site tunnel entrances jointly resist acidic environments. Finally, the enzyme was applied to an acidic fruit juice system and successfully converted high-calorie sugars to D-allulose in situ, with conversion rates exceeding 30%. Collectively, these findings indicate that ancestral enzyme A3 is a novel DAEase that combines high catalytic performance and excellent stability, highlighting its potential for industrial applications. In summary, this study proposes a potential acid-resistant modification strategy for DAEase and provides an efficient, stable biocatalyst

收稿日期：2026-02-27；修回日期：2026-03-16；接受日期：2026-03-22

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）

作者简介：赵广飞（1988-），男，高级工程师，研究方向：酶的理性设计与定向进化，E-mail：19863880123@163.com

通讯作者：吴泽华（1979-），男，博士，高级工程师，研究方向：酶的理性设计与定向进化，E-mail：labw@sina.com

support for the industrial production of functional foods rich in D-allulose.

Key words: ancestral sequence reconstruction; D-allulose; D-allulose 3-epimerase; acid resistance; functional fruit juice

引文格式：

赵广飞,董娅,梁硕,等.基于祖先序列重建的耐酸DAEase改造及应用[J].现代食品科技,2026,42(10):1-9.

ZHAO Guangfei, DONG Ya, LIANG Shuo, et al. Modification and application of acid-resistant DAEase based on ancestral sequence reconstruction [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(10): 1-9.

D-阿洛酮糖是一种公认安全的（GRAS）稀有糖，其相对甜度为蔗糖的 70%，热量仅为 0.2 kcal·g^{-1}[1-3]。同时，D-阿洛酮糖具有多种生理作用，如抗肥胖、抗高血糖、抗糖尿病、抗炎、抗氧化和神经保护作用[4-9]。因此，D-阿洛酮糖在食品和医药等行业具有重要的应用价值。D-阿洛酮糖 3 差向异构酶（DAEase）是基于 Izumoring 策略由 D-果糖生物合成 D-阿洛酮糖的关键酶，大多数 DAEase 在 7.0 至 8.0 之间表现出催化 D-果糖的最佳 pH 值[10,11]。然而，碱性会使 D-阿洛酮糖的羟基与氨基相互作用，导致非酶褐变反应加剧影响产物纯度和感官品质[12]。目前，大部分报道的 DAEase 的耐酸性极差阻碍了它们的工业应用。因此，提高 DAEase 的耐酸性和催化活性对于推动 D-阿洛酮糖的工业制造至关重要。

祖先序列重建技术（Ancestral Sequence Reconstruction, ASR）通过对现存同源野生型基因集进行多序列比对和系统发育分析，推断出古老的祖先序列，为解析酶的结构－功能演化关系提供了有力工具[13-15]。祖先酶通常具有更高的稳定性或更广的底物谱或两者兼具[14,16-18]。此前，Joho 等[19] 成功应用 ASR 获得了兼具稳定性和活性的 PETase。目前，针对 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（DAEase）的分子改造主要集中于提升热稳定性和催化效率，而关于其耐酸性改造的成功案例鲜有报道[20,21]。Qi 等[22]通过计算机辅助对来自 *Thermogutta terrifontis* 的 DAEase 进行底物口袋重塑，使其催化活性提高了 5.12 倍。Li 等[23]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。现阶段，仅发现来源于 *Dorea* sp. CAG317 的 DAEase 最适 pH 值为 6.0，但较差的稳定性限制了其工业应用[24]。相比之下，虽然来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 DAEase 最适 pH 值为 8.0，但在 pH 值 6.0 环境下仍保留了优异的热稳定性与催化活性[25]。鉴于此，本研究选取 CcDAE 作为出发蛋白，旨在利用 ASR 策略进一步提升其耐酸性能。

本研究基于兼具耐酸性与催化活性的 CcDAE，通过祖先序列重建策略挖掘出一种新型 DAEase 祖先序列 A3。在完成蛋白的表达与纯化后，对重建 DAEase 的酶学性质进行了详细表征。随后，通过分子对接、结构模拟以及序列分析解析了 A3 活性与耐酸性增强的结构基础。这展示了祖先序列重建以识别目标祖先蛋白的有效性，为具有新特性酶的半理性工程设计提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 D-阿洛酮糖3-差向异构酶的系统发育推断与祖先序列重建

祖先序列重建工作通过 FireProtASR 平台（https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotasr）完成。首先，以耐酸性 CcDAE 序列为模板，经 SwissProt 及 Catalytic Site Atlas 保守性评估锁定了包括 E150、D183、H186 和 E244 在内的多个保守残基。该平台利用 PSI-BLAST 取同源序列，通过 Clustal Ω 进行比对并结合 IQ-TREE 和 RAxML 算法构建并优化了系统发育树。最终，基于 Lazarus 的 PALM 方法推导出了祖先节点序列。统计学验证表明，该系统发育分析具有高鲁棒性，50 次自举重复实验中绝大多数节点的自举支持率（Bootstrap value）大于 70，证实了重建序列的可信度。

1.2 祖先酶的克隆过表达和蛋白纯化

本研究中使用的 DAEase 及其后代的编码基因由 Azenta 公司（中国苏州）负责合成，并通过 *Hind*III 和 *Bam*HI 限制位点被亚克隆到 pET-28a 载体中。*E. coli* JM109 被用于质粒扩增，而 *E. coli* BL21（DE3）被选为蛋白生成的表达宿主。本研究使用的分析级试剂由 Sangon Biotech 或 Sigma-Aldrich（中国上海）提供。重组菌株被接种于含有 50 mg·L^{-1} 卡那霉素的 LB 液体培养基中，在 37 ℃条件下振荡培养。当菌体密度（OD_{600}）达到 0.6~0.8 时，加入终浓度为 0.2 mmol·L^{-1} 的 IPTG，并将温度降至 16 ℃诱导蛋白表达 16~20 h。诱导结束后，离心收集菌体并通过超声破碎释放胞内蛋白。随后，利用 Ni-NTA 亲和层析柱从上清液中纯化目标 DAEase。最后，通过 SDS-PAGE 电泳分析蛋白的表达与分子量，并通过 Thermo Scientific 公司

NanoDrop 微量分光光度计（Nanodrop 2000）测定纯化后的酶浓度用于活性测定。

1.3 酶学性质的表征

通过测定 D-阿洛酮糖的产量来测定祖先酶活性。本实验的标准测定条件在 60 ℃下在含有 20 μmol·L^{-1} 酶、0.2 mmol·L^{-1} Mg^{2+}、50 g·L^{-1} D-果糖和 20 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 值 7.0）的 1.0 mL 系统中进行。反应进行 5 分钟后采用高效液相色谱法测定。将祖先酶在 20 mmol·L^{-1} Tris-HCl（pH 值 7.0）中在 60 ℃下孵育，以检测祖先酶热稳定性的变化。为了确定突变体的最佳 pH 值，反应在标准测定条件下在不同的 20 mmol·L^{-1} 缓冲液中进行（Glycine-HCl：pH 值 3.0~5.0；4-吗啉乙磺酸（MES）：pH 值 5.5~6.5；磷酸盐缓冲盐水（PBS）：pH 值 7.0~7.5；Tris-HCl：pH 值 8.0~9.0）。为了评估祖先酶的耐酸性能，我们将纯化后的酶液置于不同 pH 值（3.0~9.0）的 20 mmol·L^{-1} 缓冲体系中，在 4 ℃条件下孵育。孵育结束后，在标准反应条件下测定样品的残留活性。实验中以未经处理的初始酶活定义为 100%。反应产物 D-果糖和 D-阿洛酮糖的质量浓度如前所述采用高效液相色谱法（HPLC）进行定量分析。

1.4 高效液相色谱法（HPLC）对产品D-阿洛酮糖的鉴定

采用高效液相色谱法测定酶促反应中由 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖的量以测定酶的活性。色谱仪（Agilent 1260）配备色谱柱 Alltech PrevailTM Carbohydraye ES（5 μm，4.6×250 mm，Grace，America）和蒸发光散射检测器（Alltech Chrom, ELSD6000）。HPLC 产物鉴定的条件是 75% 乙腈和 25% ddH_2O 作为流动相，流量为 1.0 mL·min^{-1}，柱温为 40 ℃。所有测量重复三次。

1.5 分子动力学模拟

基于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 D-阿洛酮糖 3 差向异构酶 (PDB ID: 3VNI) 的晶体结构使用 SWISS-MODEL 在线服务器生成了同源的祖先酶的三维模型，并通过 PyMoL（http://www.pymol.org）进行可视化分析，模型质量分析显示其全局得分均在 0.80 以上，模型合理。为了比较 CcDAE 及其祖先酶的性质，以阐明其热稳定性提高的内在机制。将系统的初始配置保持一致，分析 pH 值为 3.0、4.0 和 7.0 时的 MD 模拟结果，以确定祖先酶在不同条件下的动态特性。Amber 软件和 Amber99SB 力场用于执行所有 MD 模拟。结构被放置在一个充满水分子的十二面体盒子，蛋白质分子与盒子边缘间隔为 1 nm。通过能量最小化了消除蛋白质和水分子之间的任何不利相互作用。为了避免蛋白质固有结构灵活性的扩散，对所有氨基酸重原子施加了 1 500 kcal·mol^{-1} 的极限力在整个模拟过程中，范德华能和短程静电能之间的截断距离为 10 Å。使用 PME 方法计算了长程静电能。实时监测均方根偏差（RMSD）和均方根波动（RMSF）变化，直到系统达到平衡，分子动力学时间设置为 20 ns。

1.6 果汁中D-阿洛酮糖的原位生产

使用先前研究的一步生物合成级联反应处理橙汁、葡萄汁、芒果汁和猕猴桃汁，该级联反应含有耐酸的祖先酶 A3、INV 和 GI。INV 催化蔗糖水解成 D-葡萄糖和 D-果糖。GI 可以将 D-葡萄糖异构化为 D-果糖[26,27]。然后，通过耐酸祖先酶 A3 将 D-果糖原位转化为 D-阿洛酮糖。100 mL 反应体系中各种酶的最终浓度均为 20 μmol·L^{-1}，反应在 60 ℃下进行 2 h。使用 pH 计测量每种果汁的 pH 值。在催化开始和结束时，通过 HPLC 测定每种果汁中蔗糖、D-葡萄糖、D-果糖和 D-阿洛酮糖的含量。

1.7 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 D-阿洛酮糖3差向异构酶的祖先序列重建

酶分子晶体结构解析对理解酶的结构－功能关系以及催化机理具有重要作用。目前，至少有 6 种不同来源的 DAEase 晶体结构被解析并保存于蛋白质数据库且具有典型的耐热性和耐碱性[28-32]。据报道，酶分子催化活性中心高度保守，每个单体亚基由 8 个 α-螺旋和 β-折叠组成经典的 TIM 桶状结构，TIM 结构中心包含一个金属离子结合位点，该位点被两个水分子及家族酶中四个完全保守的氨基酸残基（Glu、Asp、His、Glu）配位而形成八面体结构。随后，通过全自动在线祖先序列生成工具 FireProtASR 基于耐酸性的 CcDAE 进行祖先序列重建。FireProtASR 共检索出 150 个 DAEase 的同源序列，并从系统发育树的节点中预测生成了 150 条 ASR 序列（图 1）。A1 作为根节点的祖先序列，代表了进化树中最古老的节点，通常具有最广泛的序列多样性和潜在的骨架鲁棒性，但这往往伴随着与现代酶最大的进化差异[33]。通过祖先序列重建（ASR），不可能确定哪个序列在历史上是正确的，而只能推断出最可能的祖先。

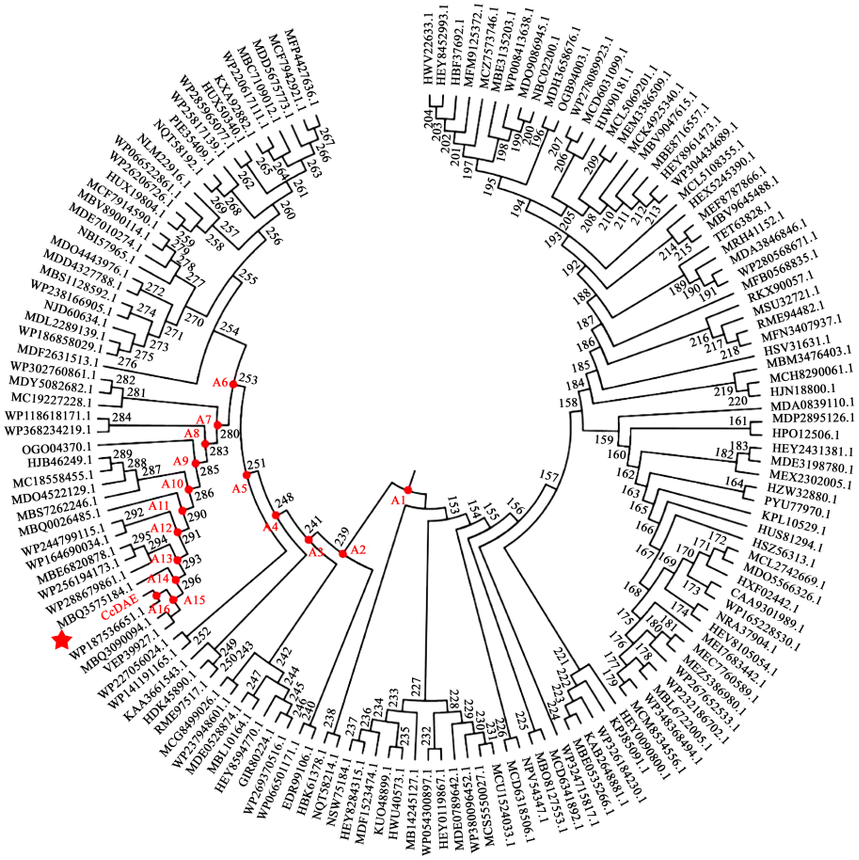


图 1 利用祖先序列重建策略复活祖先 DAEase

Fig.1 Resurrection of ancestral DAEase employing ancestral sequence reconstruction strategy

为了缩小候选的蛋白质序列空间，使用 SwissModel 生成了 16 个祖先 DAEase 的结构，模板为来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的耐酸 DAEase（PDB: 3VNI，1.98 Å）[28]。在结构预测过程中，所有模型的序列身份相对于模板的比例均超过 45%，表明结构模型已生成准确。接着，将底物 D-果糖对接到祖先酶的活性位点，预选最有潜力的候选者。评估了结合配合物的最优构型，并记录了其最低结合能值（表 1）。在去除 10 个具有较高结合能的祖先酶后，选择了剩余 6 个具有较低底物结合能的酶。考虑到 CcDAE 优异的耐酸性，假设其三维结构是祖先酶继承或具备类似耐酸性能的基础。因此，Pairwise Structure Alignment Web Server 被用于比较候选酶与 CcDAE 的相似度，均方根偏差（RMSD）被用作结构相似性的指示（表 1）。结果表明，祖先 DAEase 表现出独特的三维结构，与已知耐酸的 CcDAE 结构相比，RMSD 值在 0.72~1.75 Å 之间（表 1）。通常 RMSD 值超过 1 Å 表明结构存在显著差异。因此，我们选取了 3 个平均 RMSD 值低于 1 Å（0.72~0.81）的候选酶进行实验验证，理论计算表明这些祖先酶可能兼具活性和耐酸性。

表 1 候选祖先酶的底物结合能和RMSD

Table 1 Substrate binding energy and RMSD of candidate ancestral enzymes

Ancestral Enzyme	RMSD (Å) 3VNI	Binding Energy (k_{cal}/mol)
A1	0.72	−188.343
A2	0.75	−180.323
A3	0.81	−169.434
A4	1.05	−169.800
A5	1.14	−165.23
A6	1.12	−162.09
A7	1.31	−158.839
A3	1.23	−155.35
A9	1.35	−152.336
A10	1.42	−150.174
A11	1.28	−147.122
A12	1.83	−146.323
A13	1.60	−145.624
A14	1.64	−144.434
A15	1.75	−140.256
A16	1.68	−139.323

表 2 祖先酶A3与野生酶CcDAE的序列差异

Table 2 Sequence differences between A3 and CcDAE

位点	4	10	13	38	42	46	52	62	70	71	73	81	82	96	114
A3	H	Y	Q	F	N	E	D	D	P	A	G	N	R	G	R
CcDAE	I	F	H	S	F	D	E	E	A	T	S	P	A	K	I

位点	119	126	135	159	177	182	183	209	218	224	229	242
A3	P	G	M	N	N	V	M	R	V	R	A	T
CcDAE	T	E	V	Q	P	I	L	H	P	H	E	S

2.2 祖先酶的表达与生化表征

为了探究其生化性质和功能，克隆了选定的祖先D-阿洛酮糖 3-差向异构酶（DAEase）并将其转化至 *E. coli* BL21 表达系统中，利用 N-末端附着的 His×6 标签通过 Ni-NTA 亲和层析纯化。SDS-PAGE 分析显示祖先酶（A1 和 A2）未实现可溶性表达，仅祖先酶（A3）表现出预期的分子量（图 2）。因此，祖先酶 A3 作为候选进行后续表征实验。序列分析表明，A3 与耐酸性 CcDAE 的序列差异相比共计 27 个位点（表 2）。

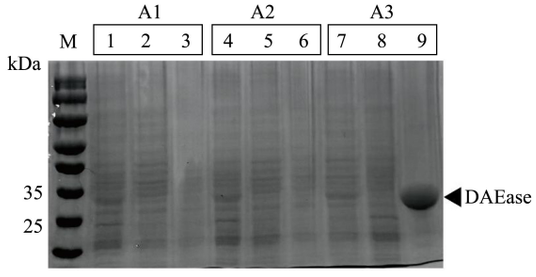
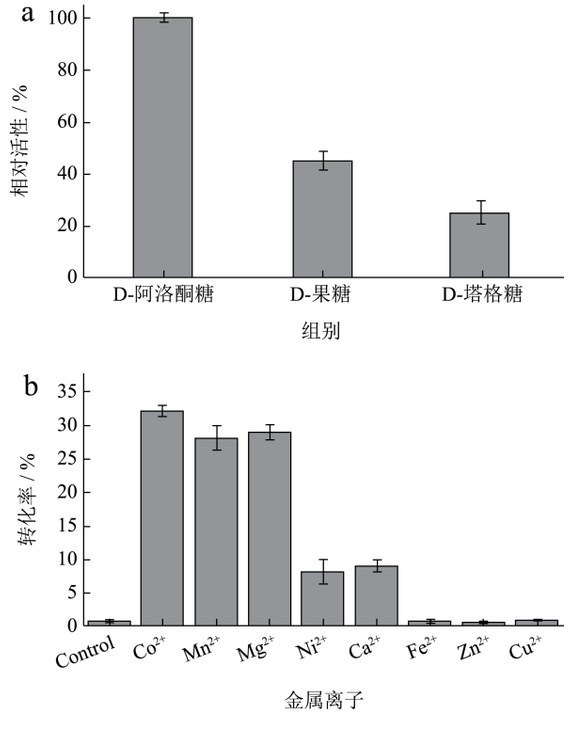


图 2 在 *E. coli* BL21（DE3）中表达纯化的 A1-A3 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed and purified A1~A3 in *E. coli* BL21 (DE3)

注：M：标准 Marker；泳道 1：A1 上清液部分；泳道 2：A1 沉淀部分；泳道 3：纯化的 A1；泳道 4：A2 上清液部分；泳道 4；A2 沉淀部分；泳道 6：纯化的 A2；泳道 7：A3 上清液部分；泳道 8：A3 沉淀部分；泳道 9：纯化的 A3。

然后，我们使用 D-阿洛酮糖、D-果糖和 D-塔格糖分析了祖先酶 A3 的底物谱，A3 对 D-阿洛酮糖的活性最高，分别是 D-果糖和 D-塔格糖的 2.2 倍和 4.0 倍（图 3a）。由于 DAEase 需要金属离子作为辅因子，我们将各种二价金属离子以 0.1 mmol·L^{-1} 的初始浓度引入反应体系。如图 3b 所示，A3 在 Co^{2+} 存在下的最大转化率为 32%。Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 是 A3 的次佳离子转化率均为 28%。在 Ni^{2+} 或 Ca^{2+} 存在下，A3 的转化率为 10% 左右。相比之下，在存在 Fe^{2+}、Zn^{2+} 或 Cu^{2+} 的情况下，A3 的转化率小于 1.0%，接近没有金属离子时的转化率（图 3b）。结果表明，A3 严格依赖于金属离子与之前报道的 DAEase 一样[28]。鉴于 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 具有重金属毒性，不符合食品工业的安全标准，催化表现同样优异且具备食品级安全性的 Mg^{2+}，成为了该酶在实际应用中极为理想的辅因子替代品。基于此，本研究进一步探究了食品级金属离子 Mg^{2+} 的最适浓度，祖先酶 A3 催化反应的最适浓度（Mg^{2+}）为 0.2 mmol·L^{-1}（图 3c）。然后，测定了温度和 pH 值对 A3 活性的影响，A3 在 50~70 ℃的温度范围均显示超过 70% 相对活性，且在 60 ℃达到最高（图 3d）。目前，大多数 DAEase 在碱性条件下（pH 值 7.0~9.0）表现出最佳活性，但酸性条件下碳水化合物的非酶褐变会减弱[10-12]。值得注意的是，A3 在 pH 值 7.0 时达到最大活性且 pH 值 4.0~7.0 时活性超过 70%，但 pH 值超过 8.0 时活性显著降低。在 pH 值 3.0 的强酸性条件下，A3 保留了最大活性的 10%（图 3e）。ASR 可以从系统进化树重建具有潜在强稳定性和催化活性的 DAEase 对工业生物催化具有重要意义。



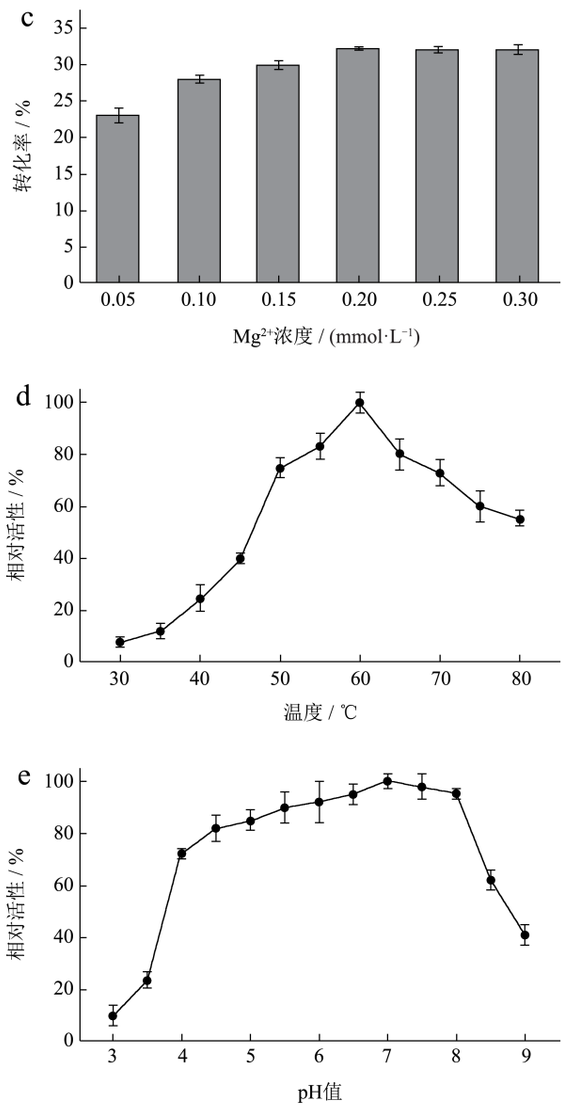


图 3 A3 的生化特性

Fig.3 Biochemical characterization of A3

注：（a）A3 的底物特异性分析；金属离子（b）、Mg^{2+} 离子浓度（c）、温度（d）和 pH 值（e）对其活性的影响。

迄今为止报道的大多数 DAEase 的最适温度均处于 55~65 ℃之间，但通常其处于其最适温度时半衰期较短，难以满足工业需求。本研究在 50~80 ℃评估了 A3 的热稳定性 , 在最适温度 60 ℃孵育 24 h 后，A3 活性仍保持在 70% 以上（图 4a）。此外，A3 在碱性环境下孵育 6 h 后仍能保留 90% 以上残余活性，但在 pH 值 4.0 条件下孵育 6 h 后仍能保留 37.51% 的残留活性，与 CcDAE 相比其耐酸性提高了 10.09 倍（图 4b）[23]。此外，在不同 pH 值的缓冲液中确定了 A3 对 D-阿洛酮糖的生物转化（图 4c）。反应系统在 60 ℃下在含有 20 μmol·L^{-1} 酶、0.2 mmol·L^{-1} Mg^{2+} 和 50 g·L^{-1} D- 果糖的 5 mL 体积中进行。结果表明，A3 在 pH 值 7.0 时 D- 果糖的转化率达到 30%。在酸性条件（pH 值 4.0）下，A3 催化 60 min 后转化率仍达到 27.85% 接近最高理论转化率。根据这些结果，A3 在酸性条件下表现出更高的稳定性和催化效率，表明其成为优质生物催化剂的潜力。

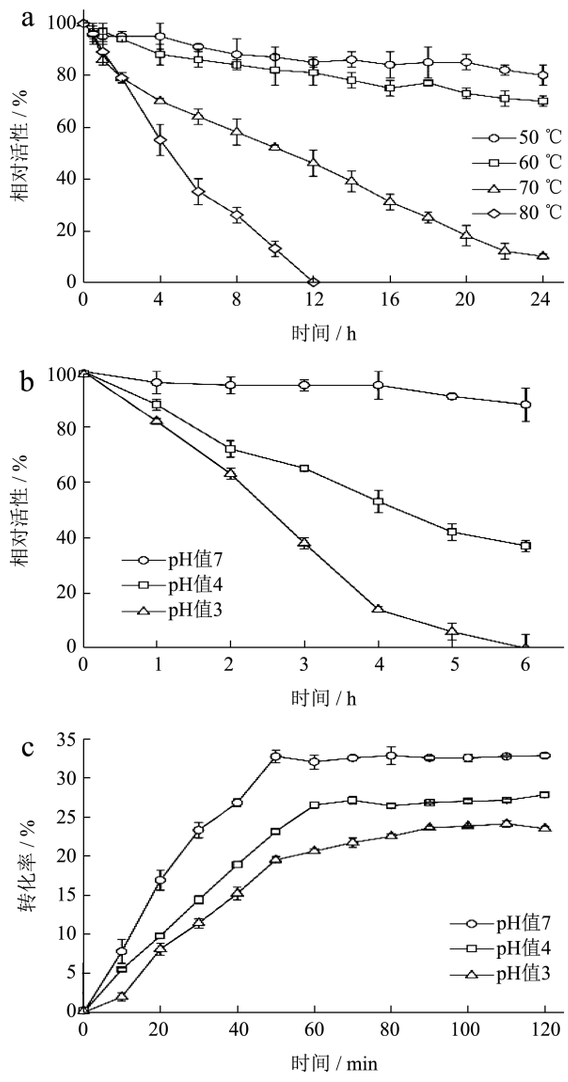


图 4 祖先酶 A3 的酶学性质

Fig.4 Enzymatic properties of A3

注：A3 的热稳定性（a）和耐酸性（b）；（c）不同 pH 值条件下在 A3 将 D-果糖生物转化为 D-阿洛酮糖的能力。

2.3 祖先酶的分子动力学模拟

氨基酸序列和三维结构被结合分析以阐明 A3 高耐酸性的可能机制（图 5a）。通过 20 ns MD 模拟获得的动态轨迹，在不同 pH 值下 A3 和野生型 CcDAE 的 RMSF 值，以研究耐酸性提高的机制。在 MD 模拟

结束时，A3 在 pH 值 7.0 和 4.0 下的 RMSD 值无显著差异，分别相对稳定在 1.23 和 1.42Å，而 CcDAE 的 RMSD 为 1.39 和 2.53Å，表明 A3 的结构比 CcDAE 更稳定。此外，在 pH 值 3.0 时 CcDAE 和 A3 的 RMSD 数据都有较大的扩散（3.51 Å 和 4.53Å）。在酸性条件下，A3 显示出更小的结构波动表明其结构稳定性有所提高，而在强酸性条件下（pH 值 3.0），这两种结构都受到了严重破坏（图 5b）。基于在 20 ns MD 模拟获得的动态轨迹计算祖先酶 A3 和 CcDAE 的 RMSF 值以比较每个残基中的扩散变化。与野生型 CcDAE 相比，祖先酶 A3 在框标记的区域显示出明显减少的结构波动，这表明突变体其结构稳定性有所提高，该区域对应于活性位点的盖子区域的 β4-α4 环（图 5c）。此外，祖先酶 A3 相较于 CcDAE 的关键氨基酸差异（S38F、F42N、A70P、I114R 和 T119P）为其稳定性的增强提供了微观结构基础。在 CcDAE 中 I114 没有氢键而 A3 中 114R 的较长侧链与 Y158 形成了两个新的氢键（图 5a）。在酸性环境中，CcDAE 因结构显著拉伸导致催化中心扭曲失活，而 A3 的差异位点远离催化中心，且 R209 与 E244 形成的氢键有效限制了催化位点偏移并防止了金属离子解离（图 5a）。同时，S38F 缩小了活性隧道入口，通过屏蔽外部酸性环境的不利影响来保护催化微环境。S38F 和 F42N 取代导致蛋白质表面疏水性的局部变化，并可能形成新的疏水相互作用；这可能部分解释了祖先酶 A3 稳定性的增强（图 5a）。此外，T119P 和 A70P 取代对热稳定性的积极影响主要归因于脯氨酸效应，分别受到活性位点周围柔性 β4-α4 环的刚性化和与 Y111 疏水相互作用的增加的影响（图 5a）。这共同解释了 A3 卓越的稳定性和催化性能，证实了祖先序列重建策略的有效性。

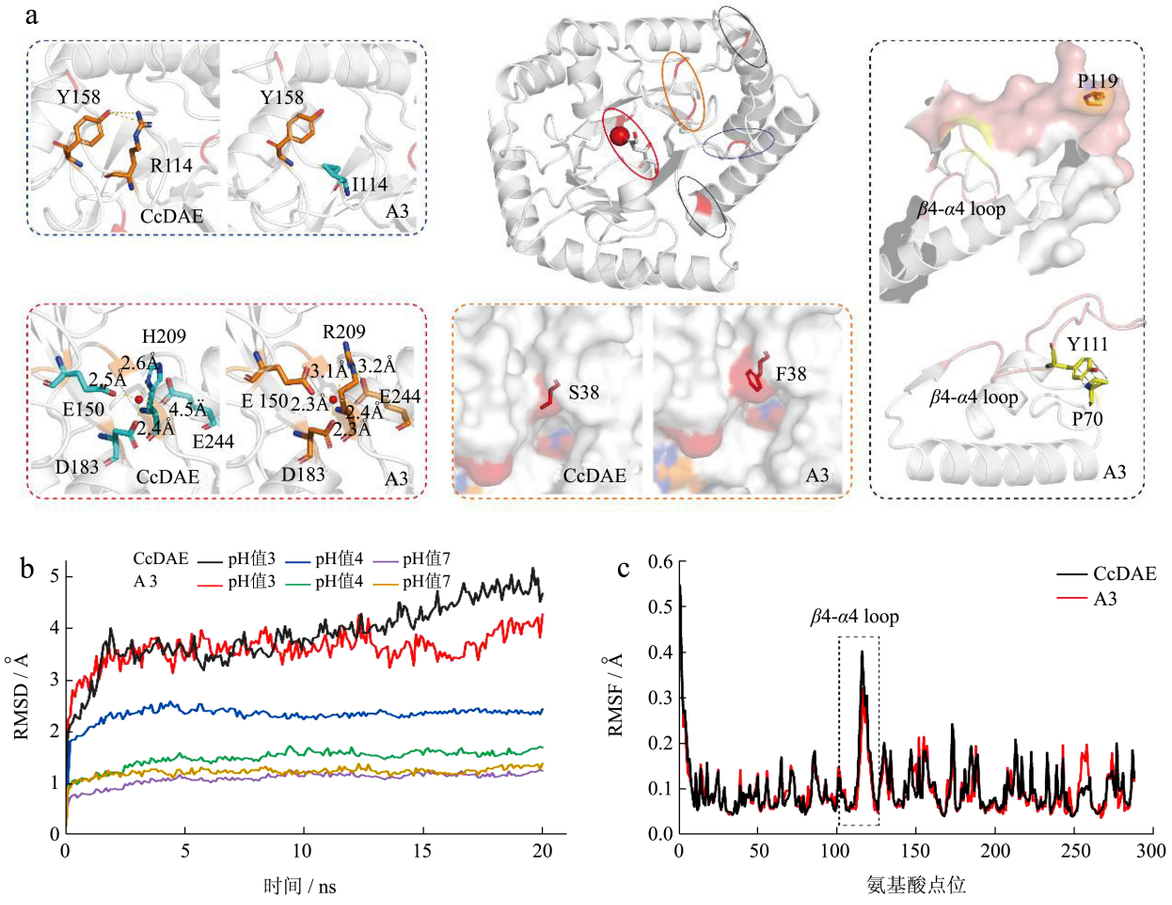


图 5 祖先酶 A3 的分子动力学模拟与结构分析

Fig.5 Molecular dynamics simulation and structural analysis of ancestral enzyme A3

注：（a）祖先酶 A3 的结构细节。在不同 pH 值下模拟 CcDAE 和 A3 的过程中，均方根偏差（RMSD）随时间（20 ns）的变化（b）和每个残基的均方根波动（RMSF）值（c）。

2.4 含D-阿洛酮糖的功能性果汁的应用研究

果汁中天然含有大量的高热量糖（如D-葡萄糖、D-果糖和蔗糖），长期过量摄入可能对健康产生负面影响。为了探索原位生产低热量功能性果汁的工艺，本研究构建了多酶级联催化体系（包含各20 μmol·L^{-1}的INV、GI和A3），在60 ℃条件下橙汁（pH值4.40）、葡萄汁（pH值4.50）、芒果汁（pH值4.30）和猕猴桃汁（pH值4.40）进行了2 h的催化处理。为契合食品工业要求，该体系全程避免了有毒重金属辅因子的使用。结果表明，A3协同INV和GI将酸性果汁中的高热量糖转化为D-阿洛酮糖。如图6所示，尽管天然果汁的酸性环境对酶活性具有一定挑战，但蔗糖仍被INV几乎完全水解，从而为A3持续积累并提供充裕的D-果糖底物。最终，在橙汁、葡萄汁、芒果汁和猕猴桃汁中，D-阿洛酮糖在总糖中的占比分别达到了16.13%（7.80 g·L^{-1}）、17.15%（13.40 g·L^{-1}）、14.82%（9.6 g·L^{-1}）和16.31%（17.7 g·L^{-1}），以果汁中D-果糖含量为基准计算其转化率均超过30%，说明所构建的多酶系统能催化复杂果汁体系实现较高效率的D-阿洛酮糖生成。利用祖先酶A3在天然酸性条件下实现功能性果汁的原位制备，极大优化了现有生产工艺，为面向特殊健康需求群体（如糖尿病或减脂人群）的功能性饮料开发提供了技术支撑。未来的工作将集中在进一步优化该体系的底物转化效率以及酶的工业化回收利用上。

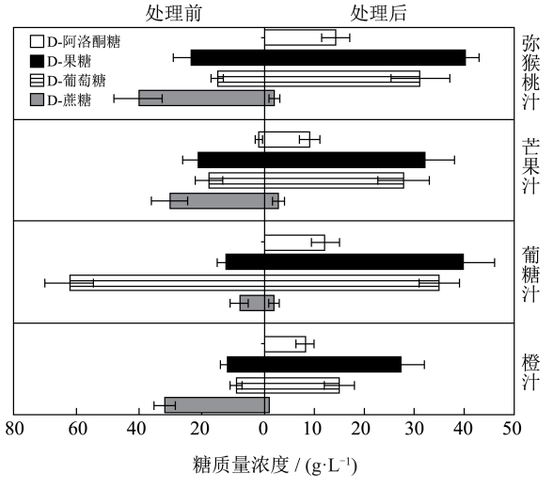


图6 处理前后的果汁中糖含量的变化

Fig.6 Content of the indicated sugars in untreated and treated juices

3 结论

传统高性能酶基因的挖掘受限于筛选方法和样品来源等因素开发效率较低。本研究以耐酸性酶CcDAE为研究对象，基于其非保守功能空间的定向重构策略构建新型酶序列，实现了酮糖3-差向异构酶催化性能与耐酸性的协同提升。结构模拟与理化性质分析表明，更多的氢键、β4-α4环刚性和活性位点隧道入口的收缩联合抵抗了酸性环境下的与金属离子流失。本研究将祖先酶A3与蔗糖转化酶（INV）及葡萄糖异构酶（GI）进行耦合设计了两步级联催化反应流程，实现了以蔗糖为起始底物的D-阿洛酮糖高效转化。在此基础上，将该多酶催化体系初步应用于减糖、低热量功能型果汁的开发探索，为D-阿洛酮糖催化合成在食品及相关领域的多场景应用提供了理论依据和技术支撑。

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 Vitamin Ology, 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(4): 113-117.

[3] ZHANG W, CHEN D, CHEN J, 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] GAO D, KAWAI N, TAMIYA T. The anti-inflammatory effects of D-allose contribute to attenuation of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Medical Hypotheses, 2011, 76(6): 911-913.

[5] IMAMURA F, O'CONNOR L, YE Z, et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction [J]. BMJ-British Medical Journal, 2015, 351: h3576.

[6] KIMURA T, KANASAKI A, HAYASHI N, et al. D-Allulose enhances postprandial fat oxidation in healthy humans [J]. Nutrition, 2017, 43-44: 16-20.

[7] SHINTANI T, YAMADA T, HAYASHI N, et al. Rare sugar syrup containing D-allulose but not high-fructose corn syrup maintains glucose tolerance and insulin sensitivity partly via hepatic glucokinase translocation in wistar rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(13): 2888-2894.

[8] YANG J, TIAN C, ZHANG T, et al. Development of food-grade expression system for D-allulose 3-epimerase preparation with tandem isoenzyme genes in *Corynebacterium glutamicum* and its application in conversion of cane molasses to D-allulose [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(4): 745-756.

[9] ZENG Y, ZHANG X, GUAN Y, et al. Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products from psicose-lysine and fructose-lysine model systems [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(3): C398-403.

[10] IZUMORI K. Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses [J]. Journal of Biotechnology, 2006, 124(4): 717-722.

[11] YOSHIHARA K, SHINOHARA Y, HIROTSU T, et al.

Bioconversion of D-psicose to D-tagatose and D-talitol by *Mucoraceae fungi* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(3): 219-222.

[12] ZHANG W, JIA M, YU S, et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of the D-psicose 3-epimerase from *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 using site-directed mutagenesis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(17): 3386-33893.

[13] GUMULYA Y, GILLAM E M. Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: the 'retro' approach to protein engineering [J]. The Biochemical Journal, 2017, 474(1): 1-19.

[14] MERKL R, STERNER R. Ancestral protein reconstruction: techniques and applications [J]. Biological Chemistry, 2016, 397(1): 1-21.

[15] SELBERG A G A, GAUCHER E A, LIBERLES D A. Ancestral sequence reconstruction: from chemical paleogenetics to maximum likelihood algorithms and beyond [J]. Journal of Molecular Evolution, 2021, 89(3): 157-164.

[16] PRAKINEE K, PHAISAN S, KONGJAROON S, et al. Ancestral sequence reconstruction for designing biocatalysts and investigating their functional mechanisms [J]. JACS Aurum, 2024, 4(12): 4571-91.

[17] RISSO V A, SANCHEZ-RUIZ J M, OZKAN S B. Biotechnological and protein-engineering implications of ancestral protein resurrection [J]. Current Opinion in Structural Biology, 2018, 51: 106-115.

[18] THOMSON R E S, CARRERA-PACHECO S E, GILLAM E M J. Engineering functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(10): 102435.

[19] JOHO Y, VONGSOUTHI V, SPENCE M A, et al. Ancestral sequence reconstruction identifies structural changes underlying the evolution of ideonella sakaiensis PETase and variants with improved stability and activity [J]. Biochemistry, 2023, 62(2): 437-450.

[20] LI C, ZHANG W, WEI C, 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.

[21] ZHU Z, LI L, ZHANG W, 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.

[22] QI H, WANG T, LI H, 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(47): 18431-18442.

[23] LI L, ZHANG Q, WANG T, 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.

[24] 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.

[25] 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.

[26] LI C, LI L, FENG Z, et al. Two-step biosynthesis of d-allulose via a multienzyme cascade for the bioconversion of fruit juices [J]. Food Chemistry, 2021, 357: 129746.

[27] TAN V W K, WEE M S M, TOMIC O, et al. Temporal sweetness and side tastes profiles of 16 sweeteners using temporal check-all-that-apply [J]. Food Research International, 2019, 121: 39-47.

[28] CHAN H C, ZHU Y, HU Y, et al. Crystal structures of D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulolyticum* H10 and its complex with ketohexose sugars [J]. Protein & Cell, 2012, 3(2): 123-131.

[29] KIM K, KIM H J, OH D K, et al. Crystal structure of D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* and its complex with true substrate D-fructose: a pivotal role of metal in catalysis, an active site for the non-phosphorylated substrate, and its conformational changes [J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 361(5): 920-931.

[30] SHIN S M, CAO T P, CHOI J M, et al. TM0416, a hyperthermophilic promiscuous nonphosphorylated sugar isomerase, catalyzes various C(5) and C(6) epimerization reactions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(10): e03291-16.

[31] YOSHIDA H, YOSHIHARA A, GULLAPALLI P K, et al. X-ray structure of *Arthrobacter globiformis* M30 ketose 3-epimerase for the production of D-allulose from D-fructose [J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications, 2018, 74(10): 669-676.

[32] YOSHIDA H, YOSHIHARA A, KATO S, et al. Crystal structure of a novel homodimeric L-ribulose 3-epimerase from *Methylomonus* sp [J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(6): 1621-1637.

[33] GUMULYA Y, BAEK J-M, WUN S-J, et al. Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction [J]. Nature Catalysis, 2018, 1(11): 878-888.