

## 研究报告

# D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的功能表征及其高活性突变体的高通量筛选

高鑫<sup>1,2,3</sup>, 杨锋<sup>1,2,3</sup>, 毛淑红<sup>1,2,3</sup>, 路福平<sup>1,2,3</sup>, 秦慧民<sup>\*1,2,3</sup>

1 天津科技大学 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津 300457

2 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

3 天津科技大学 工业酶国家工程实验室, 天津 300457

高鑫, 杨锋, 毛淑红, 路福平, 秦慧民. D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的功能表征及其高活性突变体的高通量筛选[J]. 微生物学通报, 2025, 52(7): 3098-3110.

GAO Xin, YANG Feng, MAO Shuhong, LU Fuping, QIN Huimin. Functional characterization of D-allulose 3-epimerase and high-throughput screening of its highly active mutants[J]. Microbiology China, 2025, 52(7): 3098-3110.

**摘要:**【背景】稀少糖 D-阿洛酮糖(D-allulose)是一种理想的低能量甜味剂替代品, 其在食品加工和医疗健康领域具有广泛的应用前景。D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DAEase)是生物法催化 D-果糖异构化生成 D-阿洛酮糖的关键酶。【目的】基于酶数据库进行新酶基因的挖掘, 拓宽 DAEase 的酶库资源, 并结合理性设计筛选获得催化性能优良的新型 DAEase 酶分子。【方法】用来源于氧化微杆菌(*Microbacterium oxydans*)的新酶基因(MoDAEase)构建重组表达系统, 研究该酶的酶学性质, 通过分子结构模型预测, 理性设计突变热点氨基酸, 结合高通量筛选平台筛选潜在的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶突变体。【结果】重组目标蛋白实现可溶性表达, 酶最适反应条件为 60 °C, pH 8.0, 并且在 40–60 °C 及 pH 6.5–8.5 条件下具有较好稳定性。筛选获得催化效率提高 5.35 倍的优势突变体 M110S/P249G, 用于转化 500 g/L 和 750 g/L 的 D-果糖时, 均展示出优良的催化性能。【结论】本研究从氧化微杆菌中挖掘得到了一种 DAEase 的新酶, 并筛选得到催化活性显著提高的优势突变体, 为酶法合成 D-阿洛酮糖提供了理论及实践依据。

**关键词:** D-阿洛酮糖; D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; 定向进化; 超高通量筛选

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2104901); 国家自然科学基金(32372279); 天津科技大学优秀博士学位论文创新资助项目(YB2023005)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2104901), the National Natural Science Foundation of China (32372279), and the Innovation Project of Excellent Doctoral Dissertation of Tianjin University of Science and Technology (YB2023005).

\*Corresponding author. E-mail: huiminqin@tust.edu.cn

Received: 2024-11-07; Accepted: 2024-12-27; Published online: 2025-01-23

## Functional characterization of D-allulose 3-epimerase and high-throughput screening of its highly active mutants

GAO Xin<sup>1,2,3</sup>, YANG Feng<sup>1,2,3</sup>, MAO Shuhong<sup>1,2,3</sup>, LU Fuping<sup>1,2,3</sup>, QIN Huimin<sup>\*1,2,3</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 School of Biological Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

3 National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

**Abstract: [Background]** The rare sugar D-allulose is an ideal low-calorie sweetener substitute with broad application prospects in food processing and medical health. D-allulose 3-epimerase (DAEase) is the key enzyme that is responsible for the isomerization of D-fructose to D-allulose. **[Objective]** To mine new enzyme genes from the enzyme database to broaden the library resources of DAEase and obtain new enzyme molecules with excellent catalytic performance by rational design and screening. **[Methods]** A novel DAEase from *Microbacterium oxydans* (MoDAEase) was expressed in *Escherichia coli*, and the enzymatic properties of MoDAEase were characterized. The molecular structure modeling and rational design were performed, and the potential mutant amino acids were screened by a high-throughput screening platform. **[Results]** The recombinant target protein was expressed in a soluble form, with the optimal reaction conditions of 60 °C and pH 8.0, and it remained stable at 40–60 °C and pH 6.5–8.5. The mutant M110S/P249G with 5.35-fold enhanced catalytic efficiency was identified and it exhibited excellent catalytic performance when being used to convert 500 g/L and 750 g/L D-fructose. **[Conclusion]** We mined a novel DAEase from *M. oxydans* and obtained its mutant with significantly improved catalytic activity, which provides both theoretical and practical bases for the enzymatic synthesis of D-allulose.

**Keywords:** D-allulose; D-allulose 3-epimerase; directed evolution; ultrahigh-throughput screening

D-阿洛酮糖(D-allulose)是一种低热量、稀有己酮糖,被广泛认为是最具前途的功能糖。D-阿洛酮糖具有蔗糖 70%的甜度,同时热量仅为蔗糖的 10%,被美国食品网评为最理想的蔗糖替代品,使其成为食品行业中引人注目的代糖新星<sup>[1-3]</sup>。除此之外,D-阿洛酮糖还具备多种有益生理活性的功能,如增强葡萄糖耐受量、减少脂肪堆积、清除活性氧、保护神经元功能等,这些益生功能使其成为一种天然的功能成分,在医药、营养保健品和食品工业中具有较高的商业应用价值<sup>[4-8]</sup>。

基于酮糖 3-差向异构酶(ketose 3-epimerase, KEase)家族酶的生物酶法合成策略是目前 D-阿

洛酮糖最受关注的合成方法。其中,D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DAEase)是该酶家族中的典型代表<sup>[9-11]</sup>。D-阿洛酮糖的化学合成法涉及生产过程中大量副产物的产生以及后期烦琐的除杂步骤,与之相比,酶法合成在温和的反应条件下即可实现 D-果糖向 D-阿洛酮糖的有效转化,并且具有高底物特异性<sup>[12-14]</sup>。近年来,随着费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)、球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)、解纤维素梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)等各种微生物来源的 DAEase 的发掘与表征,为 D-阿洛酮糖的酶法合成提供了越来越多的可选工具酶<sup>[15-18]</sup>。然而,酶分子自身催化效率低或稳

定性差的局限性阻碍了其在食品工业中的进一步应用。定向进化作为蛋白质工程中酶分子改造的重要手段,其可通过创造新的有益酶变体进而实现增强酶的催化性能<sup>[19-20]</sup>。其中,基于结构-功能构效关系的合理设计和功能修饰的策略进而改善 DAEase 催化性能的研究被广泛报道。Li 等<sup>[15]</sup>基于结构指导的合理设计和定向进化对 *Sinorhizobium fredii* DAEase 进行了功能改造研究,使该酶的催化效率提高了 17 倍。Li 等利用表面电荷工程结合随机诱变技术构建了 *Clostridium cellulolyticum* DAEase 的突变体文库,筛选得到了在 pH 4.5 下具有高活性(为野生型的 3.36 倍)和耐酸性(为野生型的 10.6 倍)的突变体酶<sup>[21]</sup>。因此,基于结构的理性设计策略已被证明是改造酶提升其工业应用属性的有效策略,使其能够根据不同工业应用场景定制酶分子的特性。

本研究利用 BLAST 工具在 NCBI 数据库中挖掘一种 DAEase 的新酶基因,并利用 AlphaFold v2.0 在线工具预测其蛋白质空间结构。对重组的新酶基因进行纯化与酶学性质分析,基于目标酶分子的蛋白质结构模型及 HotSpot Wizard 工具模拟指导的理性设计,结合液滴微流控高通量筛选平台,对其进行定向功能改造研究。此外,利用野生型与突变体酶催化不同浓度的底物,探究了 D-果糖酶法合成 D-阿洛酮糖的可能性,以期为 D-阿洛酮糖的工业化生产提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

氧化微杆菌(*Microbacterium oxydans*)来源的 DAEase 基因(MoDAEase, GenBank 登录号为 WP\_058633099.1)由苏州安升达生物科技有限公司进行基因的密码子优化并合成。用于质粒扩增提取的宿主(*Escherichia coli* JM109)、外源基因过表达的宿主[*E. coli* BL21(DE3)],以及用于外源基因克隆表达的载体质粒 pET22b

均为本实验室保藏。

### 1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Nde* I 和 *EcoR* I, 纽英伦生物技术(北京)有限公司; KOD plus 诱变试剂盒, 东洋纺(上海)生物科技有限公司。高效液相色谱检测仪(HPLC), 安捷伦科技(中国)有限公司。

### 1.3 重组蛋白 MoDAEase 的表达与纯化

将密码子优化的 MoDAEase 基因构建至 pET22b 载体的 *Nde* I 与 *EcoR* I 限制性酶切位点之间,构建重组表达质粒,随后转化至 *E. coli* BL21(DE3)进行目标蛋白的异源表达。将含有重组表达载体的单克隆菌落挑取至含有 50  $\mu\text{g/mL}$  硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至菌液  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 于 16  $^{\circ}\text{C}$  条件下持续低温培养 16–18 h, 诱导重组蛋白的表达。4  $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 条件下离心 15 min 收集菌体用于蛋白纯化。

将收集到的菌体在含有 20 mmol/L Tris-HCl、20 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L NaCl 的 pH 8.0 缓冲液中超声破碎(工作 2 s, 间隔 4 s, 总长 10 min, 超声功率为 200 W)。4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min 去除菌体碎片, 将上清液与 Ni-NTA Superflow 树脂结合, 并转入重力柱中。用含有 50 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl、1 mmol/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)及 20 mmol/L Tris-HCl 的缓冲液洗涤树脂以除去杂蛋白, 然后用含有 20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT pH 8.0 的洗脱缓冲液洗脱 Ni-NTA Superflow 树脂上结合的 MoDAEase。得到的纯化目标蛋白于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存以备后续实验。

### 1.4 MoDAEase 的酶学性质表征

MoDAEase 的活性测定方法: 反应体系中包括 10 g/L D-果糖、1 mmol/L  $\text{Mn}^{2+}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$  MoDAEase, 于 60  $^{\circ}\text{C}$  的恒温水浴摇床中持续振荡反应 10 min, 然后通过煮沸终止反应, 所有测量均重复 3 次以上。

为了探究 MoDAEase 的最适反应 pH, 催

化反应按照上述反应体系于 pH 5.0–10.0 的 20 mmol/L 缓冲体系[glycine-HCl: pH 5.0–5.5, MES: pH 5.5–6.5, 磷酸缓冲液(phosphate buffer): pH 6.5–8.0, Tris-HCl: pH 8.0–9.5, Glycine-NaOH: pH 9.5–10.0]中进行。为了探究 MoDAEase 的最适反应温度,在不同环境温度下(40–70 °C)按照上述催化反应体系进行活性测定。其中,最适反应条件测试中酶的相对催化活性最高的被定义为 100%。

为了测定 MoDAEase 的温度耐受性,将目标酶置于 40–70 °C 孵育 12 h,检测其相对活性,其中未经孵育的 MoDAEase 的初始活性被定义为 100%。

为了测定 MoDAEase 的 pH 耐受性,将目标酶置于 pH 5.0–8.5 孵育 6 h,检测其相对活性,其中未经孵育的 MoDAEase 的初始活性被定义为 100%。

为了测定 MoDAEase 的酶反应动力学参数,以 0–300 mmol/L 的 D-阿洛酮糖及 D-果糖为底物在最适反应条件下进行,通过使用 GraphPad Prism 8.0 软件中的非线性回归将数

据拟合到米氏方程计算米氏常数( $K_m$ )、催化转换数( $k_{cat}$ )以及催化效率( $k_{cat}/K_m$ )。

### 1.5 MoDAEase 的结构模拟与虚拟筛选

利用 AlphaFold v2.0 预测了 MoDAEase 的分子结构模型。为了获得酶-底物复合物的复合模型,使用 AutoDock 软件进行分子对接。底物 D-果糖的 3D 结构从 PubChem 网站(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获得。使用 HotSpot Wizard 在线工具(<https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>)虚拟计算获得 MoDAEase 定向进化的热点氨基酸<sup>[22]</sup>。同时使用 PyMOL (<http://www.pymol.org>)软件对 MoDAEase 的分子模型进行可视化和结构分析。

### 1.6 MoDAEase 位点饱和突变文库的构建与高通量筛选

定点饱和突变使用 KOD plus 诱变试剂盒,以 pET22b-MoDAEase 质粒为模板,由金唯智(苏州)生物科技有限公司进行。引物列于表 1 中。PCR 后用 *Dpn* I 消化去除模板,产物进一步通过 T4 连接酶与 Ligation high 环化。

将携带 MoDAEase 突变体的基因片段构建

表 1 本文用于突变体文库构建的引物

Table 1 Primers used for the mutant construction in this article

Primer name	Primer sequence (5'→3')
M39-F	TTANNKGACCCATTTTCTTTCGACGTGGCTGTAGCCA
M39-R	GGGGAACCTCTATTAATCAAATCCTGCTTCTTTAGTTTTCTGTACTGCTAATCGT
V105-F	GGCNNKATCTATAGCGCTATGAAAAAGTATATGGAGCCTGTAACCACCGAGG
V105-R	GCAGAAGTGTTTGCCGCCAAGGTCGGCT
M110-F	GCTNNKAAAAAGTATATGGAGCCTGTAACCACCGAGGGTCTGG
M110-R	GCTATAGATTACGCCGAGAAGTGTTTGCCGCCAA
Y113-F	AAGNNKATGGAGCCTGTAACCACCGAGGGTCTGG
Y113-R	TTTCATAGCGCTATAGATTACGCCGAGAAGTGTTTGCC
S188-F	GAGNNKGACATGTTTGCGCCGGTGTTAGATGCTG
S188-R	TTCGATGTTTCATATGATAAGTATCAATGTGGATACCCAAATTCGGTCTATCCACTTCCG
G207-F	ATTNNKGAATCCCATCGCGGTTACCTTGGTACTGG
G207-R	ATGGACATAGCGCAAAGCGGGGTCAGC
S243-F	TTTNNKTCCGCAGTGGTGGCACC GGACC
S243-R	ACTCTCGAAGACGATTGGGCCATCGTAGCC
P249-F	GCANNKGACCTGAGCCGTATGCTCG
P249-R	CACCACTGCGGAACTAAACTCTCGAAGACGATTGGGC

至前期构建的生物传感器质粒上,并导入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞获得 MoDAEase 突变体文库。将重组菌接种至 LB 培养基中,同时加入 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素和 0.1 mmol/L IPTG,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养 12 h。然后通过搭建的液滴微流控高通量筛选平台与 96 孔微孔板高通量筛选法对酮糖 3-差向异构酶突变体库进行筛选。步骤如下:

(1) 无菌条件下,使用相同量的新鲜培养基将重组菌种子液稀释至不同浓度( $OD_{600}=0.05-1$ ),同时向培养基中加入终浓度为 200 mmol/L 的 D-果糖。以稀释的种子液为液相,以 DREM cell 液滴发生油为载体油相,在 DREM cell 液滴发生芯片中制备液滴。其中,液相的流速为 650  $\mu\text{L}/\text{h}$ ,载体油相的流速为 1 000  $\mu\text{L}/\text{h}$ ,液滴直径约为 30  $\mu\text{m}$ 。

(2) 收集 DREM cell 液滴发生芯片制备的液滴并置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养 12 h。培养完成后,将液滴以 20  $\mu\text{L}/\text{h}$  的流速注入到 DREM cell 液滴分选芯片中,同时, DREM cell 液滴分选油以 100  $\mu\text{L}/\text{h}$  的流速使液滴进入芯片的分选区域。

(3) 液滴在流经 DREM cell 芯片的分选区域时被激光激发,并收集荧光发射波长在 485 nm 处的荧光信号,设置收集荧光信号前 1% 的液滴,收集得到的液滴使用 1H,1H,2H,2H-全氟-1-辛醇进行破乳释放液滴中的细胞,并涂布于 LB 固体培养基上。

(4) 对初步筛选获得的阳性菌株进行培养诱导后,取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液加入 96 孔板,并加入含 10 g/L D-果糖与 1 mmol/L  $\text{Co}^{2+}$  的溶液,于 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 10 min 进行复筛。最终,挑选相对活性高于野生型 MoDAEase 的突变体,进行 3 次重复筛选。

### 1.7 D-阿洛酮糖的酶法合成

为了探究 MoDAEase 及突变体催化合成 D-阿洛酮糖的性能,在 5 mL 体系中评估了 MoDAEase 及其突变体催化 500 g/L 和 750 g/L D-果糖的能力。通过定期取样,利用 HPLC 测

定 D-阿洛酮糖的生成量。

D-果糖及 D-阿洛酮糖的定性定量分析采用 HPLC 进行检测。检测条件:柱子:Rocksil Carbohydrate ES 5 $\mu$  column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm $\times$  250 mm);检测器:蒸发光散射检测器(1290 Infinity ELSD);流动相:75%乙腈;上样量:10  $\mu\text{L}$ ;流速:1 mL/min;运行时长:15 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 MoDAEase 的序列分析及结构预测

通过与已鉴定的其他微生物来源的 DAEase 家族酶的蛋白质序列进行多重序列比对,分析新挖掘的 MoDAEase 的同源序列和保守氨基酸信息。如图 1 所示,MoDAEase 与 AgDAEase 的序列相似性最高,相似度为 62.8%。除此之外,与其他 KEase 家族酶的序列相似性为 25%–40%,其中,与根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) DAEase 相似性为 26.9%<sup>[23]</sup>、与 *S. fredii* CCBAU 83666 DAEase 相似性为 31.9%<sup>[15]</sup>、与百脉根中生根瘤菌(*Mesorhizobium loti*) L-核酮糖 3-差向异构酶(L-ribulose 3-epimerase, LREase) 相似性为 39.8%<sup>[24]</sup>、与菊苣假单胞菌(*Pseudomonas cichorii*) 来源的 D-塔格糖异构酶(D-tagatose-3-epimerase, DTEase)相似性为 29.8%<sup>[25]</sup>。此外,酶催化反应过程中底物识别和金属配位的 E146、D179、H205 和 E240 为绝对保守氨基酸,表明 MoDAEase 的催化机理与其他家族成员相似,为后期的结构模拟以及基于结构-功能关系的定向进化提供了理论基础。

借助 AlphaFold v2.0 模拟了 MoDAEase 的蛋白分子结构。MoDAEase 的分子结构由 8 个  $\beta$  折叠、11 个  $\alpha$  螺旋和多个环区组成(图 2A)。通过与已解析晶体结构的 AgDAEase 的单体结构进行比对,发现 MoDAEase 在保守的核心结构处具有典型的 TIM-barrel ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> 结构域(图 2B)。分子对接同源模型显示,MoDAEase 的 4 个残基 Glu146、Asp179、His205 和 Glu240 与活性口袋中的  $\text{Mn}^{2+}$  离子配位形成催化四分体,这种

结合模式与 DAEase 家族酶的一致, 表明成功搭建了目标酶分子模型并获得了酶与底物复合物的结构模型(图 2C)。

## 2.2 MoDAEase 的酶学性质分析

初步分析 MoDAEase 的序列及结构信息表

明该酶可能具有催化活性。在 *E. coli* BL21(DE3) 中异源表达了含有目标蛋白的重组表达质粒, 并进行了蛋白纯化。如图 3 所示, 目标蛋白已成功可溶性表达并纯化, 并且蛋白表达量较为可观, 可用于后期酶活性验证及稳定性分析实验。

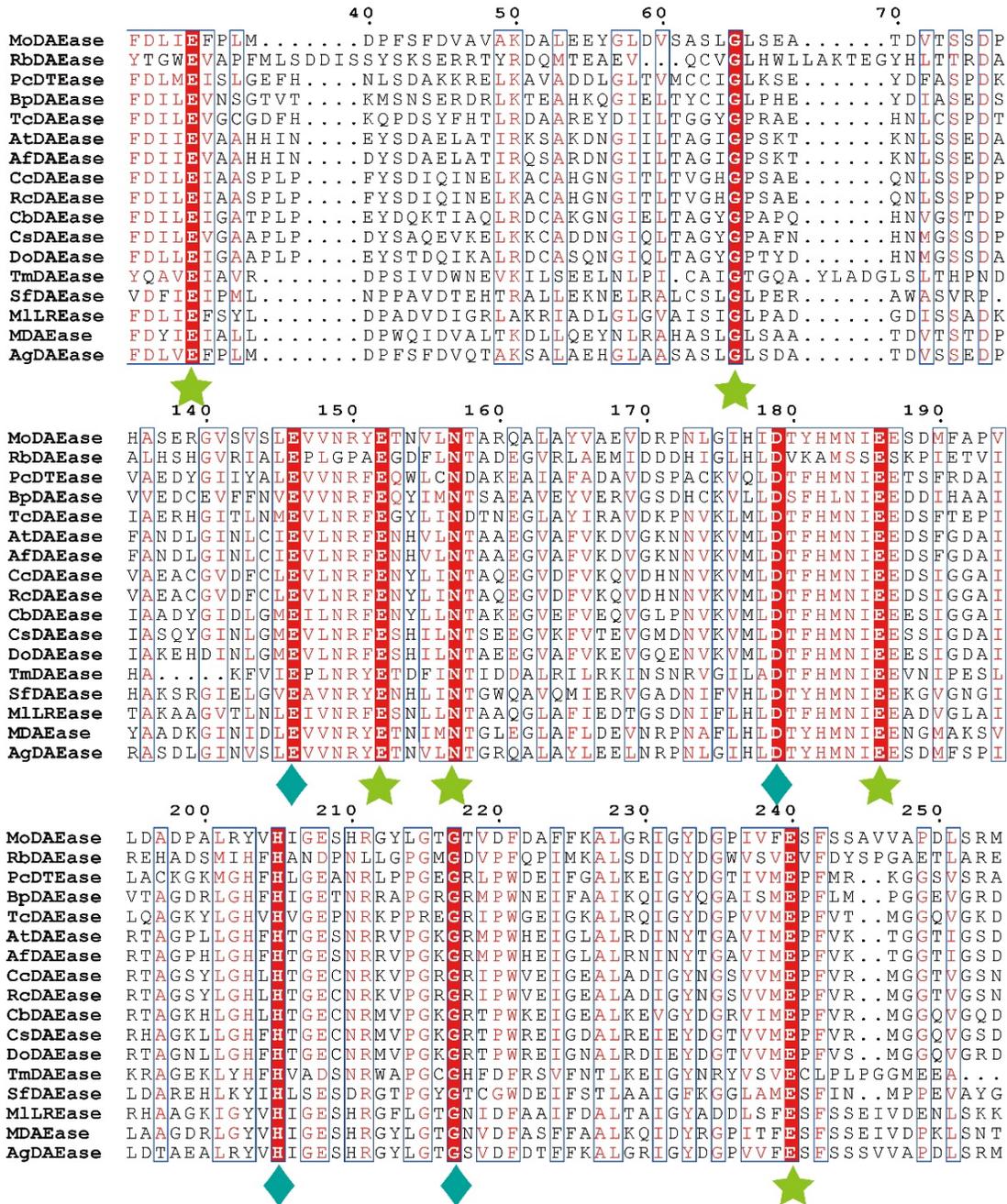
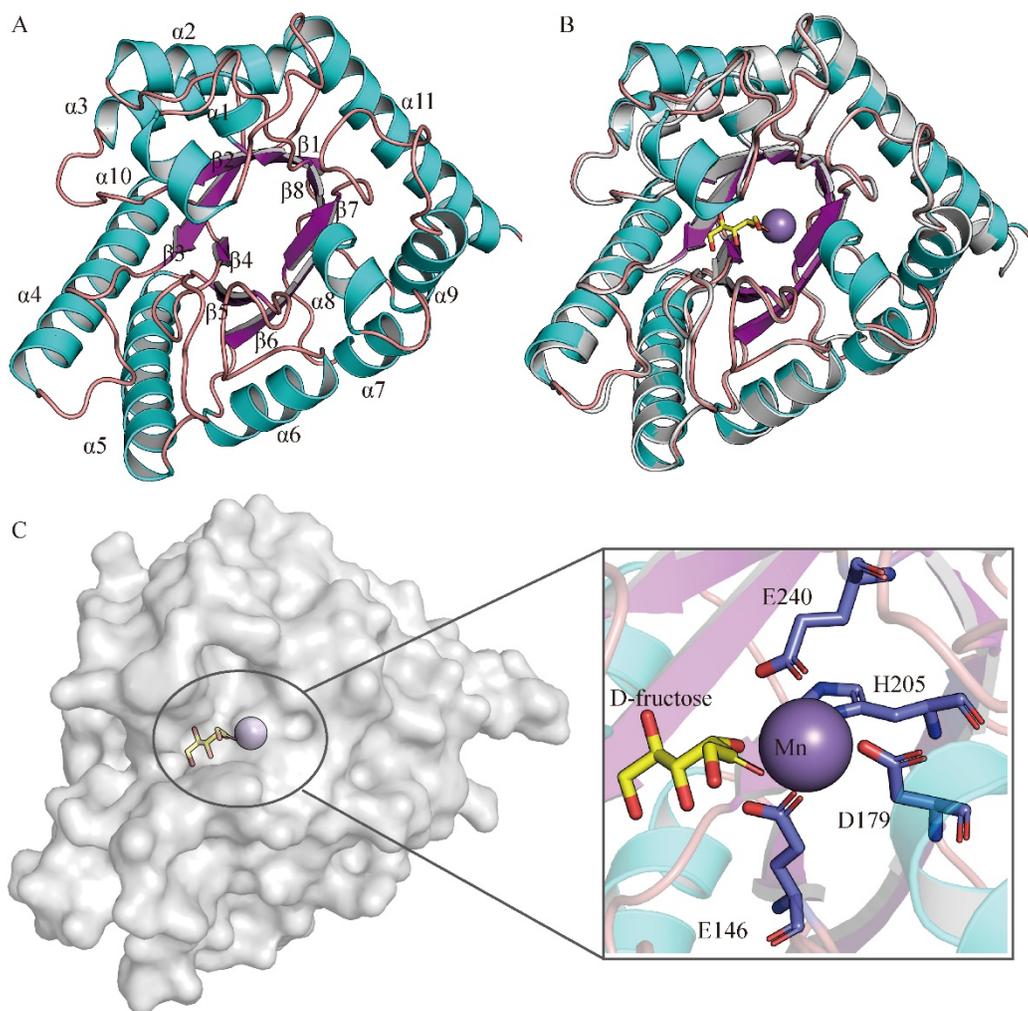


图 1 氧化微杆菌来源的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶与已报道的酮糖 3-差向异构酶的序列比对  
Figure 1 Sequences alignment for *Microbacterium oxydans* D-allulose 3-epimerase (DAEase) with other of ketose 3-epimerase that previously had been characterized.

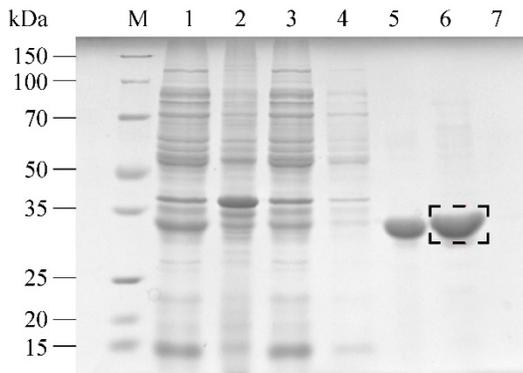


**图 2 MoDAEase 分子模型的卡通展示** A: AlphaFold v2.0 预测的 MoDAEase 的结构模型; B: MoDAEase 与 AgDAEase 结构模型的拟合; C: MoDAEase 整体结构的表面展示和催化活性口袋分析。  
**Figure 2** Cartoon representation of the MoDAEase. A: Structural model of MoDAEase predicted by AlphaFold v2.0; B: Alignment of MoDAEase and AgDAEase; C: Surface representation of the overall structure and enlarged view of the catalytically active pocket of MoDAEase.

为了评价 MoDAEase 的催化性能,测定了目标酶随温度及 pH 值变化的相对活性曲线。如图 4A 所示,MoDAEase 在 60 °C 时展示出最大的差向异构化活性,而在 45–70 °C 维持了 80% 以上的相对活性。因此,MoDAEase 的最适反应温度确定为 60 °C。此外,温度耐受性是考核该家族酶发挥催化功能的一个重要指标,关系到目标酶的具体应用场景。通过测定 MoDAEase 在 40–70 °C 孵育后的相对活性来研究其热稳定性(图 4B)。结果表明,重组

MoDAEase 在 40–60 °C 相对稳定,在 60 °C 环境下孵育 6 h 后仍保留了约 50% 的相对活性。然而,在 65 °C 及 70 °C 环境下的稳定性较差,其中,在 70 °C 条件下孵育 2.5 h 后就几乎完全丧失了催化活性。

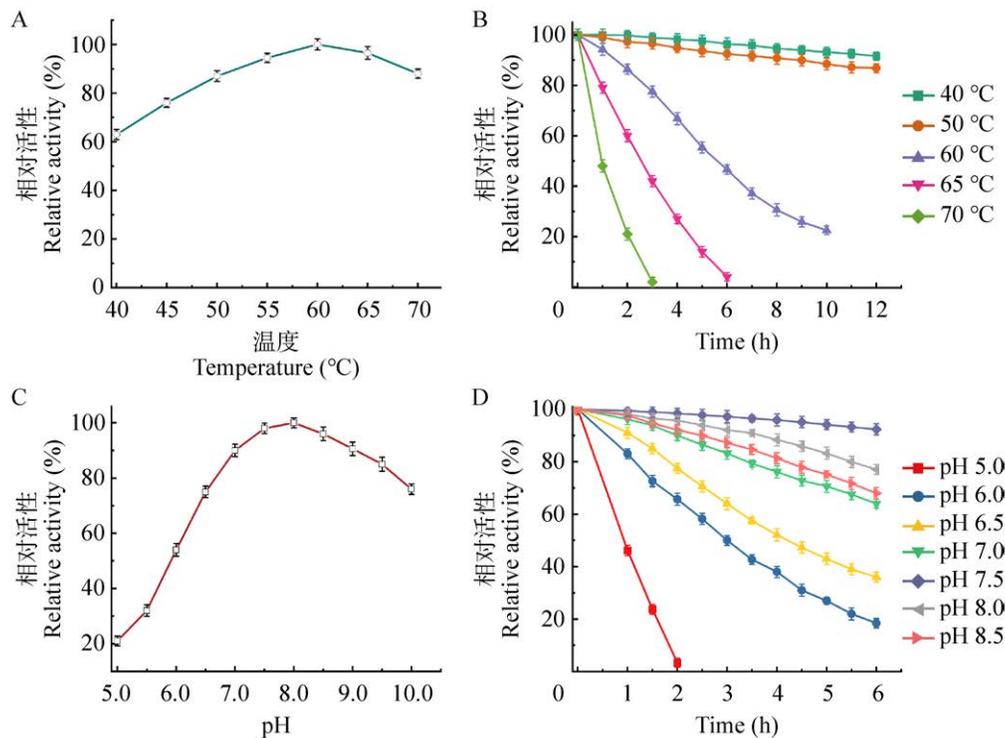
通过测定更宽范围的 pH 值(5.0–10.0)研究反应环境的 pH 对 MoDAEase 催化活性的影响。结果如图 4C 所示,MoDAEase 的最适 pH 值为 8.0,在 pH 7.0–10.0 范围内保留了 50% 以上的相对活性。此外,MoDAEase 的 pH 稳定性



**图3 重组 MoDAEase 的 SDS-PAGE 分析** M: 蛋白质分子量 marker; 1-2: 粗酶液提取物; 3: 流穿液; 4: 未结合的杂蛋白; 5: 洗脱后目标蛋白样品; 6: 洗脱后目标蛋白样品; 7: 空白对照。  
Figure 3 The SDS-PAGE analysis of the recombinant MoDAEase. M: Protein molecular weight marker; 1-2: Crude extract; 3: Flowthrough; 4: Unbound proteins; 5: The sample before elution; 6: Fractions eluted from His affinity resin; 7: The sample after elution.

结果表明, MoDAEase 在 pH 7.0–8.5 条件下更稳定, 孵育 3.5 h 后仍能保留 80% 以上的相对活性。然而, 当 pH < 6.5 时, 其相对活性急剧下降, 在 pH 5.0 条件下孵育 2 h 后丧失了全部催化活性(图 4D)。这些结果与以前的报道一致, 即最佳反应条件与大多数 KEase 家族酶的相似<sup>[15,17,23,25]</sup>。

进一步地, 采用米氏方程测定了 MoDAEase 与 D-阿洛酮糖与 D-果糖在标准反应条件下的动力学参数。结果如表 2 所示, MoDAEase 对 D-阿洛酮糖的  $K_m$ 、 $k_{cat}$  和  $k_{cat}/K_m$  值分别为 39.82 mmol/L、73.27 s<sup>-1</sup> 和 1.84 L/(mmol·s), 表明对 D-阿洛酮糖具有较高的催化活性。对于 D-果糖, 其  $k_{cat}/K_m$  值为 1.32 L/(mmol·s), 表明 MoDAEase 具有催化 D-果糖转化合成 D-阿洛酮糖的应用潜能。但是, 该酶相对较差的催化效率成为限制其进一步工业化应用的瓶颈。



**图4 重组 MoDAEase 最适反应条件的确定** A: 最适温度; B: 温度稳定性; C: 最适 pH; D: pH 稳定性。

Figure 4 The optimal reaction conditions of the recombinant MoDAEase. A: Optimal temperature; B: Temperature stability; C: Optimal pH; D: pH stability.

表 2 重组 MoDAEase 的动力学参数

Table 2 The kinetic parameters and specific activities of MoDAEase

Substrate	D-allulose	D-fructose
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	73.27	65.68
$K_{\text{m}}$ (mmol/L)	39.82	49.76
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ( $\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s})$ )	1.84	1.32

## 2.3 MoDAEase 优势突变体的筛选

采用 HotSpot Wizard 在线工具预测 MoDAEase

的突变热点氨基酸, 综合蛋白分子结构对接分析, 选取了 8 个氨基酸位点(M39, V105, M110, Y113, S188, G207, S243, P249)作为突变候选残基, 采用 NNK 简并密码子策略构建位点饱和突变体文库, 进一步提高 MoDAEase 的催化活性(图 5A)。结合本课题组先前构建的基于荧光信号的超高通量筛选平台<sup>[15]</sup>, 当体系内不存在 D-阿洛酮糖时, 转录调控因子 PsiR 结合到启动子  $P_{\text{PsiA}}$  的调控序列以阻遏其转录功能, 从而抑制

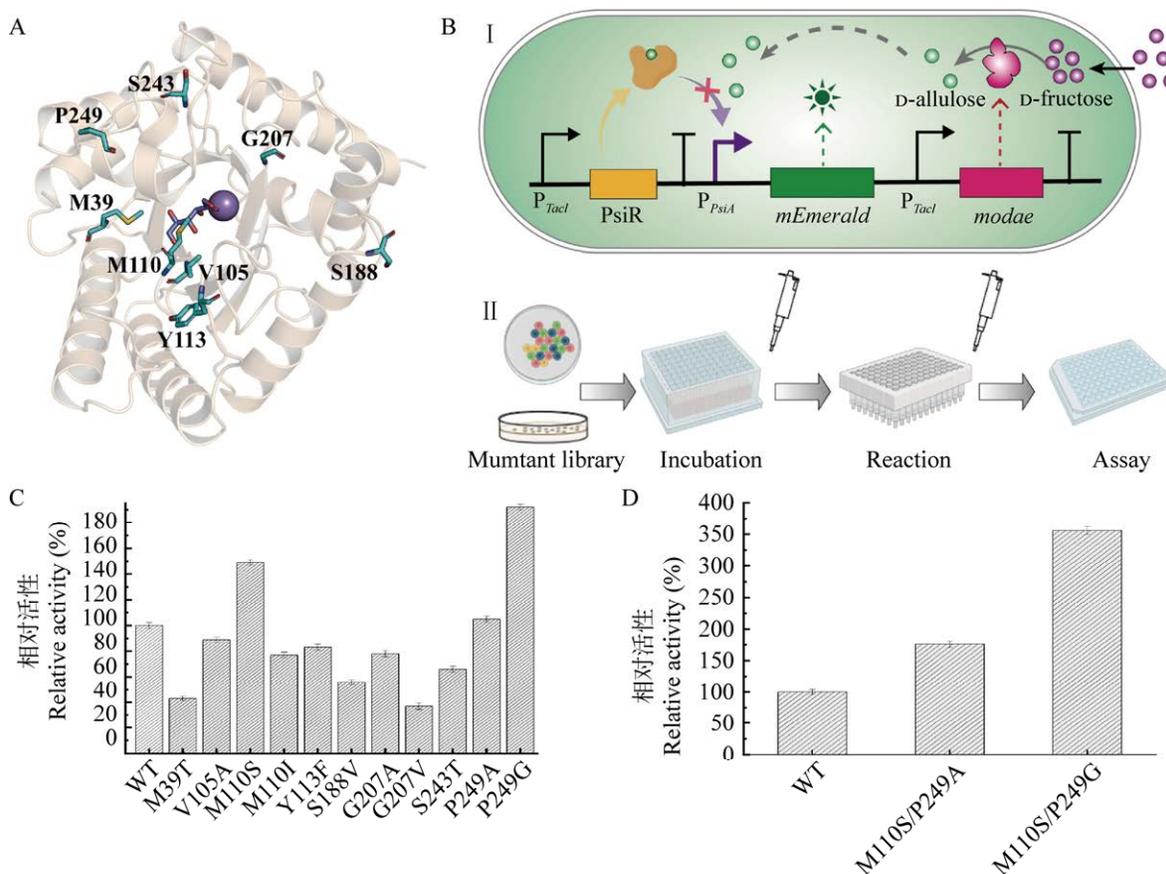


图 5 MoDAEase 高活性突变体筛选

A: HotSpot Wizard 与结构分析结合设计的潜在突变体。B: 突变体文库筛选流程。I: 基于荧光信号的液滴微流控高通量筛选; II: 基于 96 孔微孔板策略的复筛。C: 筛选鉴定出的 MoDAEase 变体的相对活性。D: M110S/P249A、M110S/P249G 以及 WT MoDAEase 的相对活性。

Figure 5 The screening in the high activity mutants of MoDAEase. A: Potential mutant sites designed by HotSpot Wizard associated with structural analysis. B: Screening process of mutant library. I: High-throughput screening based on fluorescence signal; II: Rescreening based on 96-well microplate strategy. C: Relative activity of MoDAEase variants identified from selection. D: Relative activity of WT MoDAEase, M110S/P249A, and M110S/P249G.

下游基因的表达；当 D-阿洛酮糖被引入后，PsiR 可与 D-阿洛酮糖特异性结合而从启动子  $P_{PsiA}$  调控序列上解离下来，释放下游基因的转录表达。利用启动子  $P_{PsiA}$  调控绿色荧光蛋白基因 *mEmerald* 表达，将体系中 D-阿洛酮糖的量与菌体荧光信号表型进行耦联<sup>[15]</sup>，以 MoDAEase 野生型酶的荧光信号为对照，对上述构建的突变体文库进行筛选(图 5B)。

借助液滴微流控技术分选了约 100 000 个克隆菌株并收集文库中荧光值高于野生型 1% 的单克隆，最终获得 43 株潜在优势突变体。随后采用 96 孔微孔板高通量筛选法对潜在的优势突变体进行复筛，结果如图 5C 所示，潜在突变体中经鉴定相对活性提高的有 M110S (149%)、P249G (192%)及相对活性略有提高的 P249A (105%)。因此，在迭代突变中，选取了催化效果最好的 M110S 与 P249 这 2 个位点作为新一轮的功能进化。此外，对阳性突变体的酶动力学参数也进行了测定。结果显示，突变体 M110S 的  $k_{cat}/K_m$  值为 2.15 L/(mmol·s)，相较于 WT MoDAEase [1.32 L/(mmol·s)]，催化效率提高了 1.63 倍。P249G 的催化性能显著改善，为 WT MoDAEase 的 3.21 倍[4.24 L/(mmol·s) vs. 1.32 L/(mmol·s)] (表 3)。对上述阳性突变体进行组合突变，即以突变体 M110S 为模板，在 P249 位点进行定点饱和诱变，以进一步提高突变体酶的催化性能。结果显示，双突变体 M110S/P249G 的相对活性得到了显著的提升，达到了 352%，M110S/P249A 的相对活性较野

生型也得到了改善。此外，动力学参数  $k_{cat}/K_m$  测定表明，M110S/P249G 的  $k_{cat}/K_m$  值是 WT MoDAEase 的 5.35 倍 [7.06 L/(mmol·s) vs. 1.32 L/(mmol·s)]，并且催化效率的改善得益于  $K_m$  值的明显下降(表 3)。

## 2.4 D-阿洛酮糖的酶法催化合成

为了评估 MoDAEase 及其优势突变体生物转化合成 D-阿洛酮糖的性能，以进一步指导工业化实践生产，分别以 500 g/L 与 750 g/L 高浓度水平的 D-果糖为底物进行 D-阿洛酮糖的酶促合成。如图 6 所示，WT MoDAEase 和

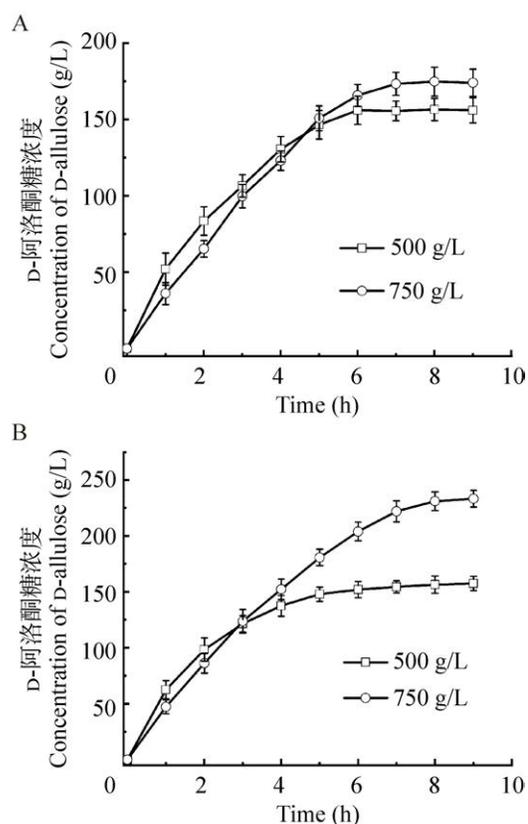


图 6 D-阿洛酮糖的催化合成 A: MoDAEase 催化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖；B: M110S/P249G 催化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖，其中底物浓度为 500 g/L 及 750 g/L。

Figure 6 The synthesis of D-allulose. A: The synthesis of D-allulose from D-fructose via MoDAEase; B: The synthesis of D-allulose from D-fructose via M110S/P249G. The concentrations of the substrate were 500 g/L and 750 g/L.

表 3 MoDAEase 及其突变体的动力学参数

Table 3 The kinetic parameters of MoDAEase and mutantst

Enzyme	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}/K_m$ (L/(mmol·s))
Wild type MoDAEase	65.68	49.76	1.32
M110S	86.32	40.15	2.15
P249G	138.10	32.57	4.24
M110S/P249G	200.22	28.36	7.06

突变体 M110S/P249G 均能催化 500 g/L 的 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖, 并且转化率约达到 30.0%。相较于已报道的家族酶, 该酶促反应的转化率高出同家族中 *P. cichorii* DTEase (20.0%)<sup>[25]</sup> 及类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) DTEase (23.0%)<sup>[26]</sup>, 而低于 *A. tumefaciens* DAEase (32.9%)<sup>[23]</sup> 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) DAEase (38.9%)<sup>[27]</sup>。另外, M110S/P249G 达到平衡所需的时间明显优于野生型, 其催化 D-阿洛酮糖合成的时空转化率由野生型的 20.2 g/(L·h) 提升到 34.8 g/(L·h), 提升了 1.7 倍。此外, 当底物浓度增加至 750 g/L 时, 突变体 M110S/P249G 转化生成 234 g/L 的 D-阿洛酮糖, 而 WT MoDAEase 仅催化生成了 174 g/L 的 D-阿洛酮糖, 表明突变体酶在催化高浓度底物时具备更好的催化效果(图 6)。这些结果说明突变体 M110S/P249G 展示出更佳的应用潜力, 可进一步应用于 D-阿洛酮糖的工业化生产。

### 3 讨论

D-阿洛酮糖因其具有高甜度低热量而备受关注, 目前, 其生产方式主要以酶法催化合成为主。DAEase 是生物催化 D-果糖合成 D-阿洛酮糖的关键酶。近年来, 已有 30 余种不同来源的 DAEase 基因被相继报道。但是, 天然酶普遍存在半衰期短, 催化活性差、底物转化水平低的弊端, 限制了 D-阿洛酮糖的酶法工业合成。

本研究以报道的 DAEase 的序列信息为模板, 成功从 NCBI 数据库中挖掘获得来源于氧化微杆菌的新型目标酶(MoDAEase)基因序列, 并利用人工智能 AlphaFold v2.0 预测了该酶的分子结构模型, 建立了分子序列-结构-功能构效关系, 确定了酶分子保守氨基酸位点、催化氨基酸位点以及金属离子结合位点等关键氨基酸位点, 进一步推测 MoDAEase 可能具有催化活性。

MoDAEase 基因在 *E. coli* 中成功重组表达, 并纯化得到可溶性目的蛋白。酶学性质分子表

明, 该酶的最适反应温度为 60 °C, 并且在 40–60 °C 条件下展示出较好的温度耐受性, 该结果与大多数同家族的酶一致, 如小梨形菌属 (*Pirellula* sp.) SH-Sr6A DAEase<sup>[5]</sup>、*S. fredii* CCBAU 83666 DAEase<sup>[15]</sup>等。此外, 与家族酶类似, 该酶更适宜于中性偏碱的反应环境, 其最适 pH 值为 8.0, 在酸性条件下其活性及稳定性较差。同时, 我们测定了 MoDAEase 的酶动力学常数, 发现以 D-阿洛酮糖为底物的  $k_{cat}/K_m$  值大于 D-果糖, 说明该酶更偏好于 D-阿洛酮糖, 并且与报道的 DAEase (*P. cichorii* DTEase<sup>[25]</sup>、*A. tumefaciens* DAEase<sup>[23]</sup> 及 *M. loti* LREase<sup>[24]</sup>) 相比, 以 D-果糖为底物 MoDAEase 的催化性能仍有提升的空间。

针对目标酶催化活性有待提高的关键问题, 本研究将 HotSpot Wizard 在线工具预测与蛋白分子结构对接分析结合, 理性设计了 MoDAEase 的热点突变氨基酸候选位点, 结合基于荧光信号的超高通量初筛平台与 96 孔微孔板的高通量复筛技术, 并基于迭代突变技术最终得到催化效率提高 5.35 倍的阳性突变体 M110S/P249G, 实现了优势变体的快速分选。进一步基于 AlphaFold v2.0 预测的野生型与突变体的分子模型探究了优势变体催化性能增强潜在的分子机制。野生型和突变型 MoDAEase 的蛋白空间构象变化对比发现, Met110 位于酶的活性口袋附近和底物通道处, 并与 Leu66 形成氢键相互作用。当 Met110 被突变为较小的氨基酸残基 Ser 时, 减小了底物结合口袋内的空间位阻, 增加了活性位点口袋的底物容纳能力, 进而提高了催化效率。另一方面, Pro249 位于 DAEase 家族酶分子底物通道上方门控“盖子结构”的铰链区, 该位置区域对酶分子的底物识别与结合具有至关重要的调控作用。当 loop 区域边缘的 P249 替换为体积更小且更灵活的 Gly 或 Ala 时, 推测该柔性区域的“盖子结构”摆动灵活性更高, 相较于野生型酶, 摆动灵活性的增强可能有助于底物识别并结合在催化口袋中, 使

得该突变体具有更高的催化效率。双突变位点的结合促进了酶分子对底物的识别能力,更宽广的底物结合口袋以更灵活的门控区域使得底物亲和力显著增强,进而有效改善了酶分子的催化性能。

MoDAEase 及其突变体实现了以不同浓度 D-果糖为底物的 D-阿洛酮糖的酶法合成,转化率达到了 30.0%,与大多数报道的家族酶的转化率一致,其中略优于同家族中 *P. cichorii* DTEase (底物浓度为 100g/L, 转化率为 20%)<sup>[25]</sup> 及 *R. sphaeroides* DTEase (底物浓度为 500 g/L, 转化率为 23%)。在催化效率方面明显高于同家族的 *S. aureus* DAEase V105A (1.45)、*Sinorhizobium* sp. DTEase [0.91 L/(mmol·s)], 以及波罗的海红小梨形菌 (*Rhodopirellula baltica*) DAEase L144F [0.72 L/(mmol·s)]。本研究结果提供了一种有价值的生物催化剂,将加速 D-阿洛酮糖工业化生产的发展。

## 4 结论

本研究挖掘得到了来源于氧化微杆菌的 DAEase 新酶基因,并通过结合理性设计与高通量筛选实现了其高活性突变体的筛选,并初步探究了阳性突变体活性改善的分子机制,为有效开发 D-阿洛酮糖的生物酶法合成提供了重要的参考。

## 作者贡献声明

高鑫:质粒构建、蛋白纯化、突变体设计及写作初稿;杨锋:野生型及突变体酶的催化活性分析;毛淑红:数据分析;路福平:构思及设计该课题;秦慧民:修改初稿,募集基金。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## REFERENCES

[1] CHATTOPADHYAY S, RAYCHAUDHURI U,

- CHAKRABORTY R. Artificial sweeteners: a review[J]. Journal of Food Science and Technology, 2014, 51(4): 611-621.
- [2] MOORADIAN AD, SMITH M, TOKUDA M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: a narrative review[J]. Clinical Nutrition ESPEN, 2017, 18: 1-8.
- [3] LI J, DAI QY, ZHU YY, XU W, ZHANG WL, CHEN YM, MU WM. Low-calorie bulk sweeteners: recent advances in physical benefits, applications, and bioproduction[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(19): 6581-6595.
- [4] CHUNG MY, OH DK, LEE KW. Hypoglycemic health benefits of D-psicose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(4): 863-869.
- [5] ZHANG WL, CHEN D, CHEN JJ, XU W, CHEN QM, WU H, GUANG CE, MU WM. D-allulose, a versatile rare sugar: recent biotechnological advances and challenges[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(22): 5661-5679.
- [6] IIDA T, HAYASHI N, YAMADA T, YOSHIKAWA Y, MIYAZATO S, KISHIMOTO Y, OKUMA K, TOKUDA M, IZUMORI K. Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans[J]. Metabolism, 2010, 59(2): 206-214.
- [7] CHEN JJ, HUANG WL, ZHANG T, LU M, JIANG B. Anti-obesity potential of rare sugar D-psicose by regulating lipid metabolism in rats[J]. Food & Function, 2019, 10(5): 2417-2425.
- [8] KIMURA T, KANASAKI A, HAYASHI N, YAMADA T, IIDA T, NAGATA Y, OKUMA K. D-Allulose enhances postprandial fat oxidation in healthy humans[J]. Nutrition, 2017, 43: 16-20.
- [9] 李超, 吴冕, 高鑫, 朱张亮, 路福平, 秦慧民. 酶法生产稀少糖的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 606-619.
- LI C, WU M, GAO X, ZHU ZL, LU FP, QIN HM. Advances in enzymatic approaches to rare sugar production[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 606-619 (in Chinese).
- [10] WAGNER N, BOSSHART A, FAILMEZGER J, BECHTOLD M, PANKE S. A separation-integrated cascade reaction to overcome thermodynamic limitations in rare-sugar synthesis[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(14): 4182-4186.
- [11] ZHU ZL, LI C, LIU X, GAO DK, WANG XY, TANOKURA M, QIN HM, LU FP. Biochemical characterization and biocatalytic application of a novel D-tagatose 3-epimerase from *Sinorhizobium* sp.[J]. RSC Advances, 2019, 9(6): 2919-2927.
- [12] LI SN, CHEN ZW, ZHANG WL, GUANG CE, MU WM. Characterization of a D-tagatose 3-epimerase from *Caballeronia fortuita* and its application in rare sugar production[J]. International Journal of Biological

- Macromolecules, 2019, 138: 536-545.
- [13] WANG Y, RAVIKUMAR Y, ZHANG GY, YUN JH, ZHANG YF, PARVEZ A, QI XH, SUN WJ. Biocatalytic synthesis of D-allulose using novel D-tagatose 3-epimerase from *Christensenella minuta*[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 622325.
- [14] JIA M, MU WM, CHU FF, ZHANG XM, JIANG B, ZHOU LL, ZHANG T. A D-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium boltea* for D-psicose production: cloning, expression, purification, and characterization[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(2): 717-725.
- [15] LI C, GAO X, QI HB, ZHANG W, LI L, WEI CC, WEI MJ, SUN XX, WANG SS, WANG LY, JI YB, MAO SH, ZHU ZL, TANOKURA M, LU FP, QIN HM. Substantial improvement of an epimerase for the synthesis of D-allulose by biosensor-based high-throughput microdroplet screening[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2023, 62(10): e202216721.
- [16] YOSHIDA H, YOSHIHARA A, GULLAPALLI PK, OHTANI K, AKIMITSU K, IZUMORI K, KAMITORI S. X-ray structure of *Arthrobacter globiformis* M30 ketose 3-epimerase for the production of D-allulose from D-fructose[J]. *Acta Crystallographica Section F*, 2018, 74(10): 669-676.
- [17] MU WM, CHU FF, XING QC, YU SH, ZHOU L, JIANG B. 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.
- [18] CHEN JJ, CHEN D, KE MY, YE SY, WANG XY, ZHANG WL, MU WM. Characterization of a recombinant D-allulose 3-epimerase from *Thermoclostridium caenicola* with potential application in D-allulose production[J]. *Molecular Biotechnology*, 2021, 63(6): 534-543.
- [19] ZHU ZL, LI L, ZHANG W, LI C, MAO SH, LU FP, QIN HM. 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.
- [20] MAO SH, CHENG XT, ZHU ZL, CHEN Y, LI C, ZHU ML, LIU X, LU FP, QIN HM. Engineering a thermostable version of D-allulose 3-epimerase from *Rhodospirellula baltica* via site-directed mutagenesis based on B-factors analysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 132: 109441.
- [21] LI L, ZHANG QQ, WANG T, QI HB, WEI MJ, LU FP, GUAN LJ, MAO SH, QIN HM. Engineering of acid-resistant D-allulose 3-epimerase for functional juice production[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(51): 16298-16306.
- [22] SUMBALOVA L, STOURAC J, MARTINEK T, BEDNAR D, DAMBORSKY J. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W356-W362.
- [23] KIM HJ, HYUN EK, KIM YS, LEE YJ, OH DK. 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.
- [24] UECHI K, TAKATA G, FUKAI Y, YOSHIHARA A, MORIMOTO K. Gene cloning and characterization of L-ribulose 3-epimerase from *Mesorhizobium loti* and its application to rare sugar production[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2013, 77(3): 511-515.
- [25] IZUMORI K, KHAN AR, OKAYA H, TSUMURA T. A new enzyme, D-ketohexose 3-epimerase, from *Pseudomonas* sp. ST-24[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57(6): 1037-1039.
- [26] ZHANG LT, MU WM, JIANG B, ZHANG T. Characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts D-fructose into D-psicose[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(6): 857-862.
- [27] ZHU ZL, GAO DK, LI C, CHEN Y, ZHU ML, LIU X, TANOKURA M, QIN HM, LU FP. Redesign of a novel D-allulose 3-epimerase from *Staphylococcus aureus* for thermostability and efficient biocatalytic production of D-allulose[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 59.