

来源于瘤胃菌 *Ruminococcus* sp.的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的底物结合位点分析

张黎丽¹ 朱玥明¹ 门燕¹ 康振奎² 孙媛霞^{1*}

(1. 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室 天津 300308)

(2. 山西天娇生物集团有限公司 山西 太原 030006)

摘要:【目的】研究来源于瘤胃菌 *Ruminococcus* sp.的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的底物结合机制。【方法】通过同源模拟和同源序列比对, 筛选与其底物结合相关的关键位点, 进而通过定点突变构建突变体并对其动力学性质进行研究。【结果】筛选得到关键位点 Y6 和 A109, 构建了突变体 Y6F、Y6I、A109P 及 A109L。【结论】Y6 既与底物结合又与催化能力相关, 其-OH 只与底物结合相关, 芳香环则与催化能力和结合能力均相关; 而 A109 则只是底物结合的位点。该研究结果为 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的催化机理研究及分子改造提供了借鉴。

关键词: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶, 同源模拟, 序列比对, 定点突变

Substrate-binding site of D-psiocose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp.

ZHANG Li-Li¹ ZHU Yue-Ming¹ MEN Yan¹ KANG Zhen-Kui² SUN Yuan-Xia^{1*}

(1. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, National Engineering Laboratory for Industrial Enzymes, Tianjin 300308, China)

(2. Shanxi Tianjiao Biological Co. Ltd., Taiyuan, Shanxi 030006, China)

Abstract: [Objective] The substrate-binding mechanism of D-psiocose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. has been studied. [Methods] The residues involved in substrate-binding were selected using homology modelling and sequence alignment. Mutants were constructed by site-directed mutagenesis and studied by kinetic analysis. [Results] Two residues, Y6 and A109, were selected. Four mutants, Y6F, Y6I, A109P and A109L were constructed. [Conclusion] Y6 was involved in both catalysis and substrate-binding by the aromatic ring of the amino acid, while the -OH was important for substrate-binding. A109 was an important site that affected binding rather than catalyzing. This research would contribute to the study of catalytic mechanism and molecular modification of D-psiocose (D-tagatose) 3-epimerase.

基金项目: 中国科学院重点部署项目(No. KSZD-EW-Z-019); 天津科技支撑项目(No. 12ZCZDSY14900); 国家自然科学基金面上项目(No. 31371789)

*通讯作者: Tel: 86-22-84861961; ✉: syx0430@hotmail.com

收稿日期: 2013-05-29; 接受日期: 2013-08-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

Keywords: D-psicose 3-epimerase, Homology modelling, Sequence alignment, Site-directed mutagenesis

稀少糖是在自然界中存在但含量极少的一类单糖及衍生物^[1],作为一种功能性甜味剂,稀少糖具有低热量、低吸收、抗龋齿、降血糖及改善肠道菌群等优点,在膳食、保健、医药等领域有广泛的应用前景。大量研究表明,稀少糖作为添加剂可以改善食品的质构^[2-5],发挥多种生理功能^[6-9],还可用于药物或活性物质修饰,进而优化其功能活性^[10]。D-阿洛酮糖作为一种重要的稀少糖,其安全性及其在食品中的应用已被日本厚生省批准,并于2011年3月完成了阿洛酮糖的商标注册,正式申请了特定保健食品。

酮糖 3-差向异构酶可催化 D-果糖与 D-阿洛酮糖及 D-塔格糖与 D-山梨糖之间的相互转化^[11]。该家族中的酶根据其作用最适底物分为: D-塔格糖 3-差向异构酶(D-tagatose 3-epimerase, DTEase, DTE)和 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-psicose 3-epimerase, DPEase, DPE)。因此,该家族酶是 D-阿洛酮糖生物转化的重要催化剂。

近年来,虽然已有多个 DPE/DTE 晶体结构成功解析^[12-14],但是对于 DPE/DTE 具体的催化机理仍无明确定论。利用定点突变的方法将特定氨基酸残基用特定类型的氨基酸进行取代后,测定其性质,从而证实该位点对催化及底物结合的贡献,这样的研究是认识底物特异性及酶催化的基础^[15]。目前,对 DPE/DTE 关键位点的研究,主要由韩国 Oh 团队^[16-18]针对来源于 *Agrobacterium tumefaciens* 的 DPE (ATDPE)所开展,国内尚未见报道。Oh 等基于 ATDPE 的晶体结构,对已报道的其活性位点附近的氨基酸进行了定点突变研究,通过实验数据确认了催化氨基酸(E150 和 E244),证明了 I66、W112、E156、H186 和 R215 位点与底物结合相关,E150、D183、H209 和 E244 则与 Mn^{2+} 相互作用,R215 与烯醇式中间体的稳定性相关;此外,通过定点突变,该团队还发现,A107 与蛋白稳定性有关,同时还影响到活性和底物结合;另外,通

过随机突变,Oh 等筛选到了热稳定性提高的突变株,相应的突变位点为 S213 和 I33,经过改造,突变体的最适反应温度较野生型提高了 7.5 °C,同时热稳定性提高了 29.9 倍。由于缺少高通量的筛选方法,通过随机突变对 DPE/DTE 进行机理研究及性质改造成本高、耗时长,因此,可通过理性/半理性设计的方法对 DPE/DTE 进行机理研究和分子改造。

本实验室已克隆了来自瘤胃菌 *Ruminococcus* sp. 的新型 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶基因,并实现了在大肠杆菌中的异源表达^[19]。该基因长度为 876 bp,编码 292 个氨基酸,蛋白质分子量约为 33 kD;酶学性质表明,在其蛋白家族中,该酶的最适反应温度最高且热稳定性最好。本研究主要利用同源模拟及序列比对的方法,筛选得到来源于 *Ruminococcus* sp. 的 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(RDPE)的底物结合相关氨基酸残基,并对其进行了定点突变验证和动力学性质研究,阐释其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

来源于瘤胃菌的 D-阿洛酮糖异构酶基因由本实验室成员克隆并构建到 pET-21a 载体中。大肠杆菌 DE3、大肠杆菌 DH5 α 均为实验室保存;高保真 DNA 聚合酶 KOD-plus 购自东洋纺;Dpn 限制性内切酶购自 Fermentas 公司;质粒小提试剂盒购自天根生化科技有限公司;引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 定点突变: 采用扩增质粒的方法,以 pET-21a-RDPE 为模板,设计完全互补配对的上下游突变引物(表 1)。PCR 反应程序为:95 °C 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,68 °C 6 min,共 16 个循环;68 °C 10 min。PCR 产物经 Dpn I 消化后,转化 *E. coli* DH5 α 感受态,涂布于含 10%氨苄青霉素

表 1 Y6 及 A109 突变研究的引物序列
Table 1 The primers used for mutagenesis of Y6 and A109

引物名称 Primers	序列 Sequences (5'→3')
Y6F-F	CATATGAAATATGGTATTTTTTACGCTTATTGGGAAAAG
Y6F-R	CTTTTCCAATAAGCGTAAAAAATACCATATTTTCATATG
Y6I-F	CATATGAAATATGGTATTTTACGCTTATTGGGAAAAG
Y6I-R	CTTTTCCAATAAGCGTAAATAATACCATATTTTCATATG
A109L-F	CATATTGTTGGAGGCTTACTCTATGGTTATTG
A109L-R	CAATAACCATAGAGTAAGCCTCCAACAATATG
A109P-F	CATATTGTTGGAGGCCACTCTATGGTTATTG
A109P-R	CAATAACCATAGAGTGGGCCTCCAACAATATG

的 LB (LB-Amp) 平板。挑取转化子培养并送至金唯智生物科技有限公司测序。若测序发现未正确突变, 则重新挑取单菌落测序或重新突变后测序, 直至突变成功。

1.2.2 基因的诱导表达及表达产物的纯化: 野生型基因及经测序验证后的突变基因, 转化 *E. coli* DE3 感受态。挑取单菌落于 LB-Amp 液体培养基, 37 °C、200 r/min 培养, 将活化的菌种转接至新的 LB-Amp 培养基, 37 °C 培养至 OD_{600} 约 0.6–0.8, 加入 IPTG (终浓度 0.5 mmol/L), 20 °C、100 r/min 诱导表达过夜。

收集菌体, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用缓冲液 I (20 mmol/L HEPES, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 悬浮菌体, 超声破碎细胞, 10 000 r/min 离心 20 min。

将上清液转移至 His SpinTrap, 根据其操作手册, 平衡用缓冲液 I, 洗脱用缓冲液 II (20 mmol/L HEPES, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 纯化蛋白。

蛋白组分采用考马斯亮蓝染色的浓度为 12% 的 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 蛋白质含量测定: 采用 Lowry 法, 以牛血清白蛋白作标准, 计算酶蛋白的含量。

1.2.4 酶活测定及动力学参数测定: 酶活通过产物 D-阿洛酮糖的生成量测定。标准反应体系如下: 50 mmol/L D-果糖, 15 μ g 纯酶, 缓冲液 I 补足至

1 mL。标准反应条件: 60 °C 反应 10 min, 煮沸 5 min 终止反应。

D-阿洛酮糖的生成量采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定。安捷伦高效液相色谱仪 1200, 分析柱: Waters Sugar Pak1, 流动相: 去离子水, 柱温: 80 °C, 流速: 0.5 mL/min, 进样量 20 μ L, 检测器: 示差检测器。

酶活单位(U)定义: 标准条件下, 每分钟催化生成 1 μ mol D-阿洛酮糖所需的酶量。

动力学分析在标准条件下进行, 以不同浓度 (10–100 mmol/L) D-果糖为底物, 测定其转化率, 按 Lineweaver-Burk 法作图, 计算得 K_m 和 k_{cat} 。

1.2.5 同源建模: 以来源于 *Clostridium cellulolyticum* H10 的 CCDPE 晶体结构 (PDB 3VNI) 为模板, 将 RDPE 的一级序列提交至在线服务器 Swiss-Model, 获得 RDPE 的 3D 结构。

使用 Swiss-PdbViewer 对所获得的 RDPE 3D 结构进行优化。

使用 PyMOL 显示优化后的 RDPE 空间结构。

1.2.6 突变体二级结构检测: 样品溶液: 浓度为 0.2 g/L 左右, 缓冲液为 10 mmol/L HEPES, pH 8.0。

仪器参数设置: 在环境温度下进行测试, 谱带宽度 1.00 nm, 响应时间 0.5 s, 扫描速度 100 nm/min, 分辨率 0.5 nm, 重复扫描 2 次, 取平均结果。

二级结构测定: 取待测溶液, 置于光径 0.1 cm 的石英样品池中, 于远紫外区 (190–250 nm) 测定, 记录二级结构图谱。

2 结果与讨论

2.1 同源模拟

经比对, CCDPE 与 RDPE 的序列相似性可达 50% 以上。因此, CCDPE 的晶体结构可以作为 RDPE 同源建模的模板, 利用在线服务器 Swiss-Model 获得 RDPE 的 3D 结构。将所得的模型用 Swiss-PdbViewer 进行分析及评估, 发现模型与模板的 C α 主链的 Root-Mean-Square (RMS) 值为 0.25; 利用 Ramachandran plots 评估模型, 发现模型 98% 以上的氨基酸残基都处于构象允许区, 因此, 模型可信度较高, 可以采用。

在 PyMOL 中, 以 DPE 的催化氨基(对应于 RDPE 的 E152/D185/H211/E246)为中心, 选择其附近 5 Å 以内的氨基酸残基, 作为底物结合区(图 1): Y6/E34/G108/A109/Y111/G150/M151/V153/L154/L162/M183/L184/T186/F187/H188/M189/N190/H209/F210/I212/G213/R217/V244/M245/P247/F248。

2.2 序列比对

为了进一步确定突变位点, 对来源于 *Agrobacterium tumefaciens*、*Clostridium cellulosyticum* H10、*Pseudomonas cichorii* ST-24 和 *Rhodobacter sphaeroides* 的 DPE 及 DTE 与 RDPE

进行了同源序列比对(图 2)。

参照突变分析的两点假设^[15], 并根据 DPE/DTE 家族蛋白的特性: DPE 的最适底物为 D-阿洛酮糖, DTE 的最适底物为 D-塔格糖, 而 RSDTE 较为特殊, 其最适底物为 D-果糖, 选择在 DPE/DTE/RSDTE 中不保守但在 DPE 中保守, 同时还要位于底物结合区的氨基酸残基作为研究的靶位点: Y6 及 A109。

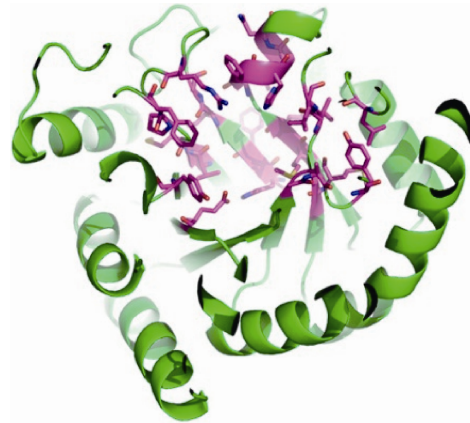


图 1 RDPE 活性中心的空间结构

Figure 1 The 3-D structure of the active site of RDPE

注: 粉红色部分为结合中心的氨基酸残基。

Note: The residues in the binding site are colored by pink.

ATDPE	..MKHGIYYSYNEHEWSAKFGPIYKVARLGGFDIIEVAHHINEYS..DAELATIRKSAKNGEIIITAGIGFSKTKNLSSEEDANVRAAGKAFERTLSNVAK	98
CCDPE	..MKHGIYYAYNEQENEADYKYYIEKVARLGGFDIIEVAASPLPFYS..HIQINELKACAHNGEITLVGHGSAEQNLSSPDPDIKNAKAFYTDLLKRLYK	98
RDPE	..MKHGIYYAYNEKENGNDYKYYIDHISLGGFDIIEVSCGAFSDYYTKQQLIDIGKYAKEKEVITTAGYGFHFNESLSSEFPNTQKQAISFWKETLRKRL	100
RSDTE	MKNFVGIISHMQIRPITSESLHFLKKSRAVGGFDIIEVPEPEPDLG...DAAEVRRICEGEGELGLVLAARVNLQRSIAEPEAAAARAGGRDYLYKCYEAAEA	98
PCDTE	..MNTYEMGFYYNSTENMVDFPATAKRIAGLGGFDIIEVSLGFEFHNLS..DARKRELKAVDDIILITVMCCIGLKSEYDFASPKRSVVDAGTEVVRRLDDCHL	99
Consensus	G LGFD E G S	
ATDPE	LDIHTIGCALHSYWFIDYSQPV.....DHAGDYARAGVEGINGIADFNLDGINLCLDVIINRFENHVRITAAAGVAVFVDRGKNNVKVMIDTFHMMIEEDSF	194
CCDPE	LDVHLIGCALYSYWFIDYTKTI.....DHKGDWERSVSVREVAKVREACGVDFCLEVIVNRFENYLDITACEGVDFVKNVDHNNVYVMIDTFHMMIEEDSI	194
RDPE	LDIHTIVGALYGYWFVDYSKPF.....DHKRDLENSIKNMKIIISQVVEEYIMMGLEVIVNRFEGYMLNITCEALAYVEEFGSSNVGVMIDTFHMMIEEDNI	196
RSDTE	LGATIVGEPFLYGEPLVFAGRPFFFWTAEQIATRAARIVGELAEVAFPLNASACKVFGLEPUNRFEDIVVNTIQAIEVVDANVGSFGLVMIDTFHMMIEEDRSI	200
PCDTE	LGAPVFEGLTFCANFQSPPLDMK.....DHRFYVDRAIESVRRVIVKVEDYGIYIADEVVNRFEQNLQDAKAIAFADANSPACKVGLITFHMNIIEEDSF	196
Consensus	G A E NRFE N V V LDTFHMN EE	
ATDPE	GLAIRTAGFLGCFHIGESNRVPEPGRMEVHEIGLARDINVTGAVIEEFPVKTGGTIGSDIKVWRLSGGADIAKMDEDARNVAFSRFVLGG...	289
CCDPE	GGAIRTAGSYLGLHTIGECNRVPEPGRIFVVEGGERLADIGANGSVVHEFPVVMGGTVGSNIKVWRISNGADEKMLDREACAPADFSRYVLECHKHS	293
RDPE	APAIRKAGDRIVCFHIGEGNRVPEPGRMLFVVEGGERLADINQCHAAVVEFPVVMGGTVGHDIKIWSIIIGNCSEVITLMDAQSAHEVKKVFEV...	291
RSDTE	PDAIRAIAGARIYVFCANENHRGEGFETIMNTIADAPALGGAGAGPVSLIEPFRRDDERVALPIAHWS...APHEDEDEKLKRAAGLIRSAITLAEVT	294
PCDTE	RDAALLACKGKMGCFHIGCANLFEPEGRLEWDEIFGALKEIGDGTIVVEFPVRRKGSVSRVAVGWRVMSNGATDEEMERARRSQVVRDLA.....	290
Consensus	AI H E R PG G W I AL Y EPF WR D L	

图 2 DPE/DTE 的同源序列比对

Figure 2 Sequence alignment of DPE/DTE

注: 序列比对通过 DNAMAN 软件实现。深蓝色代表保守性为 100% 的位点, 粉红色表示保守性大于 75% 的位点, 蓝绿色表示保守性大于 50% 的位点。

Note: The alignment was generated using DNAMAN. Three levels of conserved residues are shaded in dark blue (100%), pink (75%) and cyan (50%), respectively.

2.3 定点突变

利用突变引物(表 1), 以野生型质粒为模板进行 PCR 扩增, 获得突变体。通过定点突变, 将 6 位的 Tyr 及 109 位的 Ala 分别用其同源序列(PCDTE 和 RSDTE)中相应位点的氨基酸 Phe/Ile 及 Pro/Leu 进行取代。实验表明, 各突变体均能正确表达, 且都有可溶性表达, 纯化后, 其纯度均可达 90%以上, 见图 3, 可用于动力学性质分析。

2.4 动力学参数的测定

野生型及突变型 RDPE 的动力学参数的测定均以 D-果糖为底物, 结果见表 2。由 K_m 值的变化可以发现, 相对于 WT 来说, Y6F 对底物的亲和力略降低, 而 A109P 的底物亲和力降低了 7 倍左右, Y6I 则降低了 16 倍左右, A109L 降低最严重, 约为 18 倍; 由 k_{cat} 值可以得出: 与 WT 相比, A109P 的转化数略有提高; Y6F、A109L 没有明显变化;

Y6I 则降低 10 倍左右; 由 k_{cat}/K_m 值可以看出, 突变体的催化活性普遍降低, Y6F 降低了 40%左右, Y6I 则降低了 99%以上, A109P 降低了 70%左右, A109L 降低了近 90%。

Y6F 及 A109L 的转化数较野生型来说无明显变化, 但对底物的亲和力下降, 从而导致了催化效率的降低; Y6I 转化数降低的同时, 亲和力也降低, 因此催化效率降低严重; 而 A109P 转化数较野生型略有提高, 但亲和力却大大降低, 转化数的增大幅度远远不及亲和力降低的幅度, 因此催化效率整体呈降低趋势。

综上所述, Y6 不仅与底物结合相关, 还与酶的催化活性有关, 其中 Y 的 -OH 与底物结合相关, 而芳香环的疏水作用对底物结合的影响更大, 并且还会影响催化活性; A109 基本只与底物结合相关, 对催化活性的影响不明显。

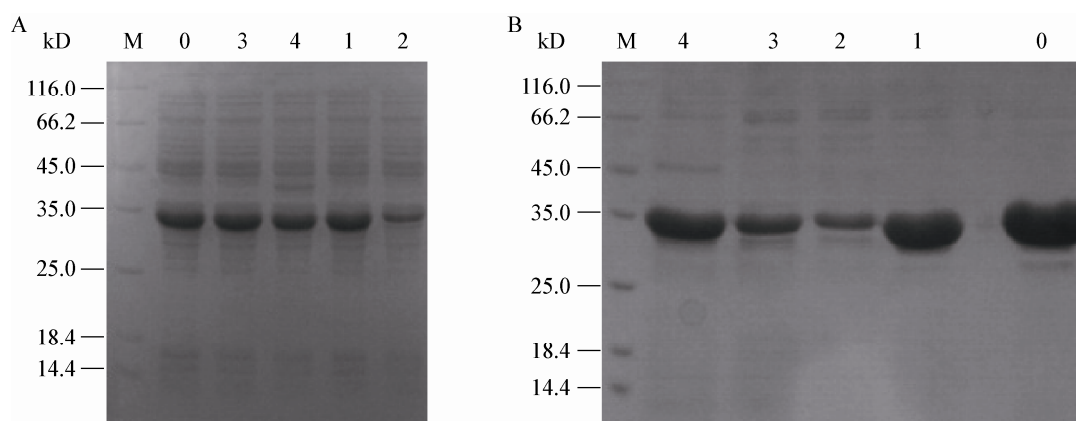


图 3 表达及纯化后的野生型和突变体的 SDS-PAGE 检测

Figure 3 SDS-PAGE analysis of the wild-type and mutants expressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified by His SpinTrap

注: A: 诱导表达后提取的粗酶液; B: His SpinTrap 纯化后的样品。0: 野生型; 1-4: 突变体 Y6F、Y6I、A109P 和 A109L。

Note: A: Cell-free extracts from *E. coli* BL21(DE3) transformed with wild-type and 4 mutant plasmids; B: The wild-type and mutant purified by His SpinTrap. 0: The wild-type; 1-4: The mutant Y6F, Y6I, A109P and A109L.

表 2 RDPE 及其突变体的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters determined of the RDPE wild type and mutants for D-fructose			
Strains	K_m (mmol/L)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m [L/(mmol·min)]
WT	221	1.4×10^4	62.0
Y6F	381	1.5×10^4	38.0
Y6I	3 614	1.1×10^3	0.3
A109P	1 608	6.6×10^4	20.0
A109L	4 025	1.3×10^4	3.2

2.5 Y6/A109 突变体的二级结构检测

由 WT、Y6F、Y6I、A109P 及 A109L 二级结构的 CD 光谱(图 4)可以看出,各突变体的二级结构与野生型相比,没有明显变化,即 RDPE 突变后没有引起结构的变化,这表明各个突变体活性的降低不是由结构变化所导致。

由于 RDPE 与其同源蛋白 CCDPE 的序列相似性较高,超过 50%,而且 Y6 及 A109 为 DPE 中的完全保守位点。因此,可通过 CCDPE 的晶体结构信息,初步解释 RDPE 的 Y6 及 A109 影响底物结合的原因。

由 Y6 及其附近的氨基酸残基及作用力(图 5A)可以看出, Y6 与 D-果糖的 O6 形成氢键,且与催化氨基酸 E244 位置相邻。突变体 Y6F 中, DPE 与 D-果糖间的氢键被打断,即底物结合作用力减弱,但不会影响到其他位点。因此,突变体 Y6F 的底物结合能力变弱, K_m 值增大,但转化能力不变;而 Y6I 中,不仅酶与底物间的氢键作用被打断,芳香环的作用也被消除。虽然, Ile 也具有疏水作用,但在野生型中, Y6 周围有多个芳香环存在,形成了芳香环的密堆积,而 Y6I 打破了这种密堆积,使得疏水作用降低,从而大大影响了底

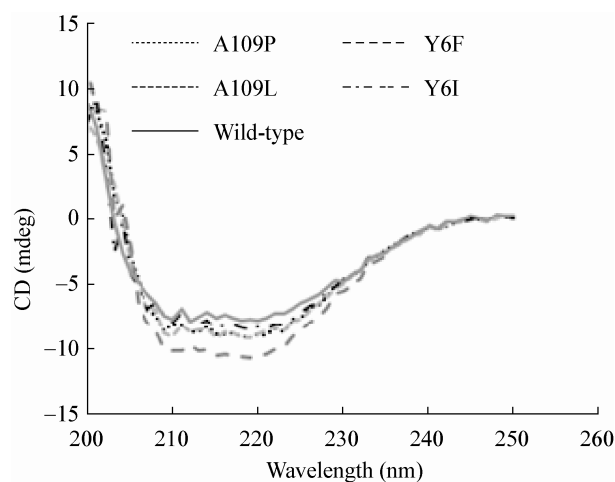


图 4 RDPE 及其突变体的 CD 谱

Figure 4 CD spectra of the wild-type and mutants

物结合,此外,根据 Yoshida 等^[13]提出的催化氨基酸 E152 和 E246 离子化形式的调节机制, Y6I 可能干扰了催化氨基酸 E244 周围的水环境,从而影响了 E244 的解离状态,最终导致催化活性的降低。

而对于 A107 (对应于 RDPE 的 A109)而言,其处于柔性的 Loop 上,周围有一系列疏水侧链,且距离催化氨基酸较远(图 5B),可能对于转化能力的影响较小。A107 突变为 Pro 后,由于 Pro 为一剧烈转折氨基酸,可能会导致该位点处 Loop 走向的变化,从而导致附近其他氨基酸残基的轻微变化,影响底物结合的原有构象;而将 Ala 突变为 Leu 后,疏水侧链明显增长,增大了底物结合时的空间位阻,大大降低了底物结合能力。

3 结论

本文首先采用同源建模定义底物结合中心,选择处于催化中心内的氨基酸残基作为第一轮位点筛选结果;然后进行同源序列比对,依据定点突变的两点假设及 DPE/DTE 的生化特性,选择第一轮筛选所得位点中不完全保守的位点,作为第二轮筛选结果,最终筛选得到了可能与其底物结合相关的关键位点 Y6 及 A109。进而通过定点突变研究和动力学参数研究,并结合结构信息,证实 Y6 为既影响底物结合又影响催化能力的位点; A109 为只影响底物结合的位点,与催化功能无关。此外, Y6 的 -OH 可与底物形成氢键,从而影响底物结合,而 Y6 的芳香环可与其周围的其他芳香环形成疏水作用更强的密堆积,不仅利于底物的结合,还维持了催化残基离子化所必需的水环境。A109 由于处于柔性的 Loop 区,且远离催化残基,作为最小的疏水残基,为底物结合提供了空间,因此,只与底物结合相关,对催化活性的影响不明显。

本文通过对 D-阿洛酮糖(塔格糖) 3-差向异构酶与底物结合位点分析,为 DPE/DTE 的催化机理研究提供了借鉴,同时,也为该家族酶蛋白的分子改造奠定了基础。

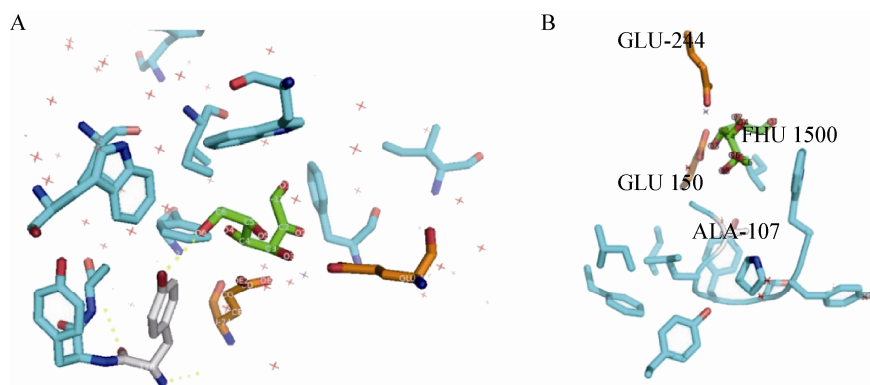


图 5 Y6 及 A107 附近的氨基酸残基及作用力

Figure 5 Residues and contacts around Y6 and A107

注: A: Y6 附近的氨基酸残基及作用力。橘黄色表示的是催化残基, 绿色表示的是底物(D-果糖), 灰色表示的是 Y6。B: A107 附近的氨基酸残基及作用力。橘黄色表示的是催化残基, 绿色表示的是底物(D-果糖), 灰色表示的是 A107。

Note: A: Residues and contacts around Y6. The catalytic residues are colored by orange, the substrate (D-fructose) is colored by green, Y6 is colored by grey. B: Residues and contacts around A107. The catalytic residues are colored by orange, the substrate (D-fructose) is colored by green, A107 is colored by grey.

参考文献

- [1] Izumori K. Bioproduction strategies for rare hexose sugars[J]. *Naturwissenschaften*, 2002, 89(3): 120-124.
- [2] Sun Y, Hayakawa S, Ogawa M, 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.
- [3] Sun Y, Hayakawa S, Puangmanee S, et al. Chemical properties and antioxidative activity of glycosylated α -lactalbumin with a rare sugar, D-allose, by Maillard reaction[J]. *Food Chemistry*, 2006, 95(3): 509-517.
- [4] Sun Y, Hayakawa S, Ogawa M, et al. Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose[J]. *Food Control*, 2007, 18(3): 220-227.
- [5] Sun Y, Hayakawa S, Izumori K. Antioxidative activity and gelling rheological properties of dried egg white glycosylated with a rare keto-hexose through the Maillard reaction[J]. *Journal of Food Science*, 2004, 69(6): C427-C434.
- [6] Granström TB, Takata G, Tokuda M, et al. Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2004, 97(2): 89-94.
- [7] Livesey G, Brown J. D-tagatose is a bulk sweetener with zero energy determined in rats[J]. *The Journal of Nutrition*, 1996, 126(6): 1601.
- [8] Yamaguchi F, Kamitori K, Sanada K, et al. Rare sugar D-allose enhances anti-tumor effect of 5-fluorouracil on the human hepatocellular carcinoma cell line HuH-7[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(3): 248-252.
- [9] Yokohira M, Hosokawa K, Yamakawa K, et al. Potential inhibitory effects of D-allose, a rare sugar, on liver preneoplastic lesion development in F344 rat medium-term bioassay[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 105(5): 545-553.
- [10] Zhu L, Cao X, Chen W, et al. Syntheses and biological activities of daunorubicin analogs with uncommon sugars[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13(23): 6381-6387.
- [11] 沐万孟, 张涛, 江波, 等. D-塔格糖3-差向异构酶家族蛋白的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2007(9): 127-131.
- [12] Kim K, Kim HJ, Oh DK, 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.
- [13] Yoshida H, Yamada M, Nishitani T, et al. Crystal structures of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas cichorii* and its complexes with D-tagatose and D-fructose[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374(2): 443-453.
- [14] Chan HC, 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.
- [15] 王大成. 蛋白质工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 60-64.
- [16] Kim HJ, Yeom SJ, Kim K, et al. Mutational analysis of the active site residues of a D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2): 261-268.
- [17] Kim HJ, Lim BC, Yeom SJ, et al. Roles of Ile66 and Ala107 of D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* in binding O6 of its substrate, D-fructose[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(1): 113-118.
- [18] Choi JG, Ju YH, Yeom SJ, et al. Improvement in the thermostability of D-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens* by random and site-directed mutagenesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7316-7320.
- [19] Zhu Y, Men Y, Bai W, et al. Overexpression of D-psicose 3-epimerase from *Ruminococcus* sp. in *Escherichia coli* and its potential application in D-psicose production[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(10): 1901-1906.