第 41 卷 第 1 期
2026 年 2 月

天津科技大学学报
Journal of Tianjin University of Science and Technology

Vol. 41 No. 1
Feb. 2026

DOI：10.13364/j.issn.1672-6510.20240101
网络首发日期：2024–11–05；网络首发地址：http://link.cnki.net/urlid/12.1355.n.20241105.1455.005

基于“序列–结构–机理”的计算机辅助 DAEase 新序列挖掘

丁文涛[1,2]，黄 驰[1]，刘臣飒[1]，李若涵[1]，王昌禄[1,2]，郭庆彬[1,2]
（1. 天津科技大学食品科学与工程学院，天津 300457；
2. 天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室，天津 300457）

摘 要：为丰富 *D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶（*D*-allulose 3-epimerase，DAEase）家族成员，采用序列比对、同源建模、分子对接、蛋白表达、酶活检测等方法，建立基于“序列–结构–机理”的计算机辅助 DAEase 挖掘新策略，成功筛选到 DAEase 新序列并对其进行表征。利用模板探针从 NCBI 数据库中筛选同源序列，根据对接质量、关键氨基酸数量、底物氢键个数及催化机理对候选序列进行综合评分；合成不同分值的 DAEase 候选序列进行表达验证，发现 2 个高分候选序列具备明显 DAEase 催化活性，而 3 个低分候选序列催化活性极低，与预测相吻合。对活性较高的来源于厚壁细菌（*Firmicutes bacterium*）HGW 的 DAEase（Fbh-DAEase）进行表征，结果显示：Fbh-DAEase 为非金属离子依赖酶，其最适反应 pH 为 6.5；最适温度为 55 ℃，45、50、55 ℃的半衰期分别为 3.9、2.3、1.7 h；最适反应条件下 Fbh-DAEase 的比活力达到 254.3 U/mg。以 500 g/L *D*–果糖为底物时，Fbh-DAEase 催化反应 8 h 后 *D*–阿洛酮糖产量达到 137.8 g/L，转化率为 27.56%。与现有 DAEase 相比，Fbh-DAEase 的比活力和热稳定性都达到较高水平，且最适 pH 为弱酸性，具有一定的应用价值。

关键词：*D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶；新酶挖掘；*D*–阿洛酮糖；生物转化；合成生物学
中图分类号：Q93 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-6510（2026）01-0001-10

Computer-Assisted Mining of a New Sequence of DAEase Based on “Sequence-Structure-Mechanism” Strategy

DING Wentao[1,2], HUANG Chi[1], LIU Chensa[1], LI Ruohan[1], WANG Changlu[1,2], GUO Qingbin[1,2]
（1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China）

Abstract: To enrich the family of *D*-allulose 3-epimerase (DAEase), the present study developed a novel computer-assisted DAEase mining strategy based on “sequence-structure-mechanism” approach via applying sequence comparison, homology modelling, molecular docking, protein expression, and enzyme activity assay. By using this strategy, DAEase sequences were successfully identified, and one DAEase sequence was characterized. Homologous sequences were screened from the NCBI database via sequence alignment with template probes, and the candidate sequences were comprehensively scored based on the docking quality, the number of hydrogen bonds and the catalytic mechanism consistency. The coding genes for DAEase candidates with different scores were synthesized, and expressed for the function validation. Two high-scoring candidates exhibited significant DAEase catalytic activity, whereas three low-scoring candidates showed deficient catalytic activity, which was consistent with predictions. The DAEase from *Firmicutes bacterium* HGW (Fbh-DAEase) with the highest catalytic capacity was further characterized, and it was found that metal ions were not essential for activity. The optimal pH of Fbh-DAEase was 6.5, the optimal temperature was 55 ℃, with the half-life of 3.9 h, 2.3 h and 1.7 h at 45 ℃, 50 ℃ and

收稿日期：2024–05–11；**修回日期**：2024–08–05
基金项目：国家自然科学基金项目（31501041，32272277）；中国博士后科学基金项目（2019M650450）
作者简介：丁文涛（1984—），男，山东人，助理研究员；**通信作者**：郭庆彬，教授，guoqingbin008322@tust.edu.cn

55 ℃, respectively. The specific enzyme activity of Fbh-DAEase reached 254.3 U/mg under the optimal conditions. In a reaction with 500 g/L *D*-fructose as the substrate, by the catalyzing of Fbh-DAEase for 8 h, the resulted *D*-allulose production reached 137.8 g/L, and a maximum *D*-allulose conversion rate was 27.56%. Compared with existing DAEases, Fbh-DAEase demonstrated higher specific activity and thermal stability, with an optimal pH of Fbh-DAEase in the weakly acidic range, thus highlighting its significant application potential.

Key words: *D*-allulose 3-epimerase; new enzyme mining; *D*-allulose; bio-transformation; synthetic biology

引文格式:

丁文涛, 黄驰, 刘臣飒, 等. 基于“序列–结构–机理”的计算机辅助 DAEase 新序列挖掘[J]. 天津科技大学学报, 2026, 41(1): 1–10.

DING W T, HUANG C, LIU C S, et al. Computer-assisted mining of a new sequence of DAEase based on “Sequence-Structure-Mechanism” strategy[J]. Journal of Tianjin university of science and technology, 2026, 41(1): 1–10.

D–阿洛酮糖(*D*-allulose)是一种低热量的功能性糖, 具有抑制血糖升高[1]、加速脂肪氧化[2]、降低炎症细胞因子水平[3]等多种功能, 是能够代替蔗糖的新兴甜味剂。*D*–阿洛酮糖在自然界中含量稀少, 直接提取成本较高, 目前主要通过 *D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶(DAEase)催化底物 *D*–果糖发生异构化反应进行生产[4]。其中, DAEase 的催化活性、热稳定性、pH 稳定性、最适金属离子等性质对 *D*–阿洛酮糖的工业化生产至关重要[5-6]。目前, 已报道的 DAEase 有 30 余种, 其催化活性和热稳定性在工业化应用中仍显不足; 挖掘 DAEase 新序列、丰富 DAEase 家族成员对深入解析 DAEase 的催化机理、改善 DAEase 催化性能具有重要意义。

目前, 新酶序列可通过生物筛选法或序列筛选法两种策略进行挖掘。生物筛选法是先从自然界中筛选具有特定功能的生物, 进而通过测序、比对等方法获取目标酶的序列和编码基因; 序列筛选法则是利用已有的 DNA、蛋白质等序列文库, 通过与已知功能的蛋白质序列比对, 从数据库中直接筛选新序列, 再通过实验验证其功能。前者实验周期长、工作量大。Yoshihara 等[7]从日本各地收集了数百种土壤样品, 鉴定出来源于球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)的 DAEase。张龙涛等[8]对从鱼塘淤泥、水样中采集的几百种微生物样品进行富集分离, 最终筛选出来源于球形红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)SK011 菌株的酮糖异构酶。序列筛选法不受生物实体的限制, 初步的序列筛选快速, 来源更加广泛, 但是一般准确度较差, 需要配合高通量筛选等方法进行大量验证。Li 等[9]基于序列比对获取候选蛋白, 通过人工合成多条编码 DAEase 的基因, 利用连续分光光度分析验证其酶活力, 成功获取来源于费氏中华根瘤菌(*Sinorhizobium fredii*)CCBAU 83666 的 DAEase。陈佳俊[10]通过序列比对及序列特征注释获取大量候选蛋白, 经过序列合成、重组表达与高通量验证后, 成功筛选出来源于嗜热微生物(*Thermoclostridium caenicola*)的 DAEase。常规序列筛选法预测准确度低, 需要合成大量候选序列进行验证, 依赖高通量筛选方法, 对实验条件要求高, 常导致资源浪费和较高的研发风险。因此, 研究高效的序列筛选与评价方法, 提高预测准确度, 对提高新序列挖掘效率、充分发挥生物资源潜力具有重要意义。

为了克服常规序列筛选法预测准确度低、验证通量大、研发风险高等问题, 本文综合运用序列比对、同源建模与分子对接等技术, 建立一种基于“序列–结构–机理”的新酶序列挖掘策略; 对不同预测分值的序列进行合成、表达与功能验证, 验证新策略预测的准确性; 表征所获得新 DAEase 序列的催化特性, 研究其在 *D*–阿洛酮糖生产中的应用。

1　材料与方法

1.1　重组质粒、菌株和实验试剂

将来源于厚壁细菌(*Firmicutes bacterium*)HGW、基睿提菌(*Kiritimatiellae bacterium*)、瘤胃梭菌(*Ruminiclostridium* sp.)、梭菌(*Clostridia bacterium*)和海勒摩氏梭菌(*Clostridium hylemorae*)的 DAEase 分别命名为 Fbh-DAEase(GenBank: PKM58594.1)、Kb-DAEase(GenBank: MBR4170875.1)、Rsp-DAEase(GenBank: HBR01360.1)、Cba-DAEase(GenBank: NCC75983.1)和 Ch-DAEase(GenBank: WP-138263192.1)。将上述目标蛋白的编码序列根据大肠杆菌(*Escherichia coli*)密码子偏好进行优化, 人工合成(天津中合基因科技有限公司)并克隆到 pET-22b(+)载体的 *Nde* Ⅰ和 *Hin*dⅢ酶切位点之间, 如图 1

所示。重组质粒分别命名为 pET-22b-Fbh、pET-22b-Kb、pET-22b-Rsp、pET-22b-Cba 和 pET-22b-Ch。转化 *E. coli* BL21(DE3)，获得表达目标蛋白的重组工程菌，分别命名为 BL21-pET-22b-Fbh、BL21-pET-22b-Kb、BL21-pET-22b-Rsp、BL21-pET-22b-Cba 和 BL21-pET-22b-Ch。所有试剂购买自北京索莱宝科技有限公司。培养基为 LBA 液体培养基(酵母浸粉 5 g/L，胰蛋白胨 10 g/L，氯化钠 10 g/L，氨苄青霉素 100 mg/L)。

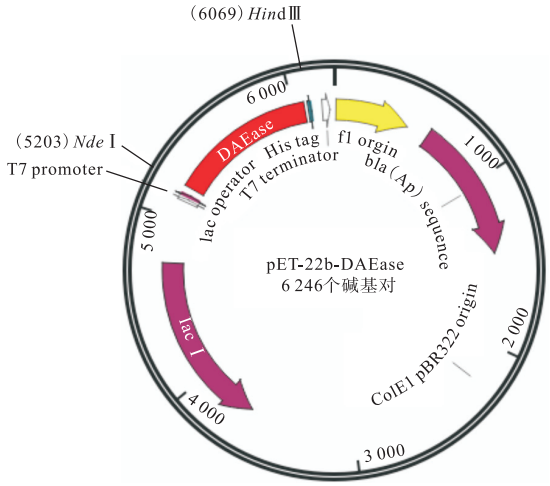


图 1　pET-22b-DAEase 载体设计示意图

Fig. 1　Schematic diagram of pET-22b-DAEase vector design

1.2　实验方法

1.2.1　*D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶的基因挖掘

以目前已报道催化活力及热稳定性表现较好的来源于纤维素梭菌(*C. cellulolyticum*)H10[11](Cc-DAEase)、梭状芽孢杆菌(*C. bolteae*)ATCC Baa-613[12](Cb-DAEase)和芽孢杆菌(*Desmospora* sp.)8437[13](Dsp-DAEase)的 DAEase 序列作为探针模板，在 NCBI 数据库中分别利用 BLASTP 功能进行比对，选取相似度在 65% ~ 85% 范围内的基因序列(约 80 条)进行进一步分析。用 Mega 7 软件构建不同来源 DAEase 的系统发育树，分析蛋白质同源性。

1.2.2　同源建模–分子对接

借助 Swiss-Model(http://swissmodel.expasy.org/)对 DAEase 序列进行结构预测，选取与目的蛋白同源且序列一致性最高的已知蛋白质结构为模板，进行同源建模，对已构建的模型进行质量评估，确定结构模型的质量。用两种方法评估 DAEase 结构模型的可靠性：(1)通过 PROCHECK 软件对结构模型中残基 Cα 二面角的合理性进行评估；(2)通过 Verify3D 软件对结构模型与其自身氨基酸序列的相容性进行评估。

在 PubChem(http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)中获得 *D*–果糖的二维结构，通过 Discovery Studio 软件进行小分子配体的 3D 化，同时将 DAEase 结构模型与 *D*–果糖 3D 模型进行可视化分析，在 DAEase 结构模型的活性口袋中心与 3D 化的 *D*–果糖进行分子对接，通过 Pymol 软件进行分子对接结果可视化分析，选取目的蛋白序列。

1.2.3　DAEase 的表达

涂板活化：使用接种环蘸取保存在甘油中的 BL21-pET-22b-Fbh、BL21-pET-22b-Kb、BL21-pET-22b-Rsp、BL21-pET-22b-Cba 和 BL21-pET-22b-Ch，涂布于带有 AMP(终质量浓度 100 μg/mL)的平板上，37 ℃培养 12 ~ 14 h。

活化培养：在平板中选取长势较好的 *E. coli* BL21 单菌落，接种至 10 mL LBA 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 培养 12 h。

发酵培养：按 1% 的接种量，将活化培养后的菌液转接至 500 mL LBA 液体培养基中，37 ℃、200 r/min 恒温摇床培养 1.5 ~ 2 h，监测 600 nm 处的吸光度(A_{600})。

低温诱导：当菌液 A_{600} = 0.6 ~ 0.8 时，加入终质量浓度为 100 μg/mL 的异丙基–β–*D*–硫代半乳糖苷(IPTG)诱导 DAEase 的表达，16 ℃、200 r/min 培养 12 ~ 16 h。

离心收集菌体：菌液经诱导表达后，4 ℃、4 000 r/min 离心 20 min，收集菌体沉淀，使用 PBS 缓冲液(50 mmol/L，pH 7.5)重悬菌体后再次离心(4 ℃、4 000 r/min 离心 25 min)，收集菌体。

1.2.4　DAEase 的分离纯化

由于重组 DAEase 蛋白上连接了 6×His 标签，所以可用 Ni^{2+}亲和层析法进行蛋白质纯化。

向离心收集的菌体中加入 50 mL PBS 缓冲液重悬，置于冰上，超声(功率为 180 W)破碎细胞，超声时间 45 min(开 2 s，关 5 s)。将细胞破碎液于 4 ℃、8 000 r/min 离心 20 min，收集上清液，通过 0.45 μm 水系滤膜去除杂质，得到粗酶液。依次用超纯水和洗涤缓冲液冲洗 Ni^{2+}层析柱，将粗酶液以 0.5 mL/min 流量流入 Ni^{2+}层析柱，结合 2 ~ 3 次，用洗涤缓冲液洗脱杂蛋白，最后用洗脱缓冲液将目的蛋白洗下并收集。用截留相对分子质量为 2×10^4 的超滤管浓缩目的蛋白洗脱液，并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次。利用

BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)测定样品中蛋白质浓度。

1.2.5　DAEase 反应条件

反应体系:PBS 缓冲溶液 50 mmol/L(pH 7.0),*D*–果糖 500 g/L,DAEase 1 μmol/L。将上述反应体系置于 55 ℃恒温水浴锅中反应 0.5 h,反应结束后煮沸 10 min 终止反应,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行高效液相色谱(HPLC)分析。

1.2.6　产物的高效液相色谱分析

使用 Agilent LC1200 高效液相色谱仪进行分析。色谱条件:Waters Sugar-Pak Ⅰ色谱柱,柱温 80 ℃,示差折光检测器,流动相为超纯水,流量 0.6 mL/min,进样量 10 μL。

1.2.7　DAEase 酶学性质测定

按照1.2.5 节方法配制反应体系,分别改变体系中的温度、pH 及金属离子,测定不同条件下的酶活力。

酶活力定义(1 U):在 55 ℃条件下,单位时间(1 min)内 DAEase 催化 *D*–果糖生成 1 μmol *D*–阿洛酮糖所需要的酶量。根据 *D*–阿洛酮糖的浓度($c_{D-阿洛酮糖}$)和 *D*–果糖的浓度($c_{D-果糖}$),按照式(1)计算转化率(*R*)。

$$R=\frac{c_{D-阿洛酮糖}}{c_{D-阿洛酮糖}+c_{D-果糖}}\times 100\% \tag{1}$$

1.3　数据分析

所有实验均重复进行 3 次,数据以“平均值 ± 标准偏差”表示。使用 Prism、SPSS 软件中 *t* 检验和 *q* 检验对数据进行方差分析和多重测试分析。

2　结果与讨论

2.1　基于序列、结构及催化机理策略的 DAEase 新酶挖掘

2.1.1　基于序列信息的 DAEase 候选序列选取

用 Mega 7 软件比对候选序列和部分已知的 DAEase 序列,构建系统发育树,结果如图 2 所示。候选序列可分为 3 个聚类(Cluster):Cluster 1 中的候选序列与来源于根瘤菌属(*Mesorhizobium japonicum*)MAFF 303099、球形节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)的 DAEase 处于同一进化分支;Cluster 2 中的候选序列与来源于厌氧菌(*Halanaerobium congolense*)、瘤胃梭菌(*Ruminiclostridium cellulolyticum*)的 DAEase 处于同一进化分支;Cluster 3 中的候选序列与来源于纤维素梭菌(*C. cellulolyticum*)、梭状芽孢杆菌(*C. bolteae*)和芽孢杆菌(*Desmospora* sp.)8437 的 DAEase 处于同一进化分支。

2.1.2　基于同源建模和分子对接的蛋白质结构分析

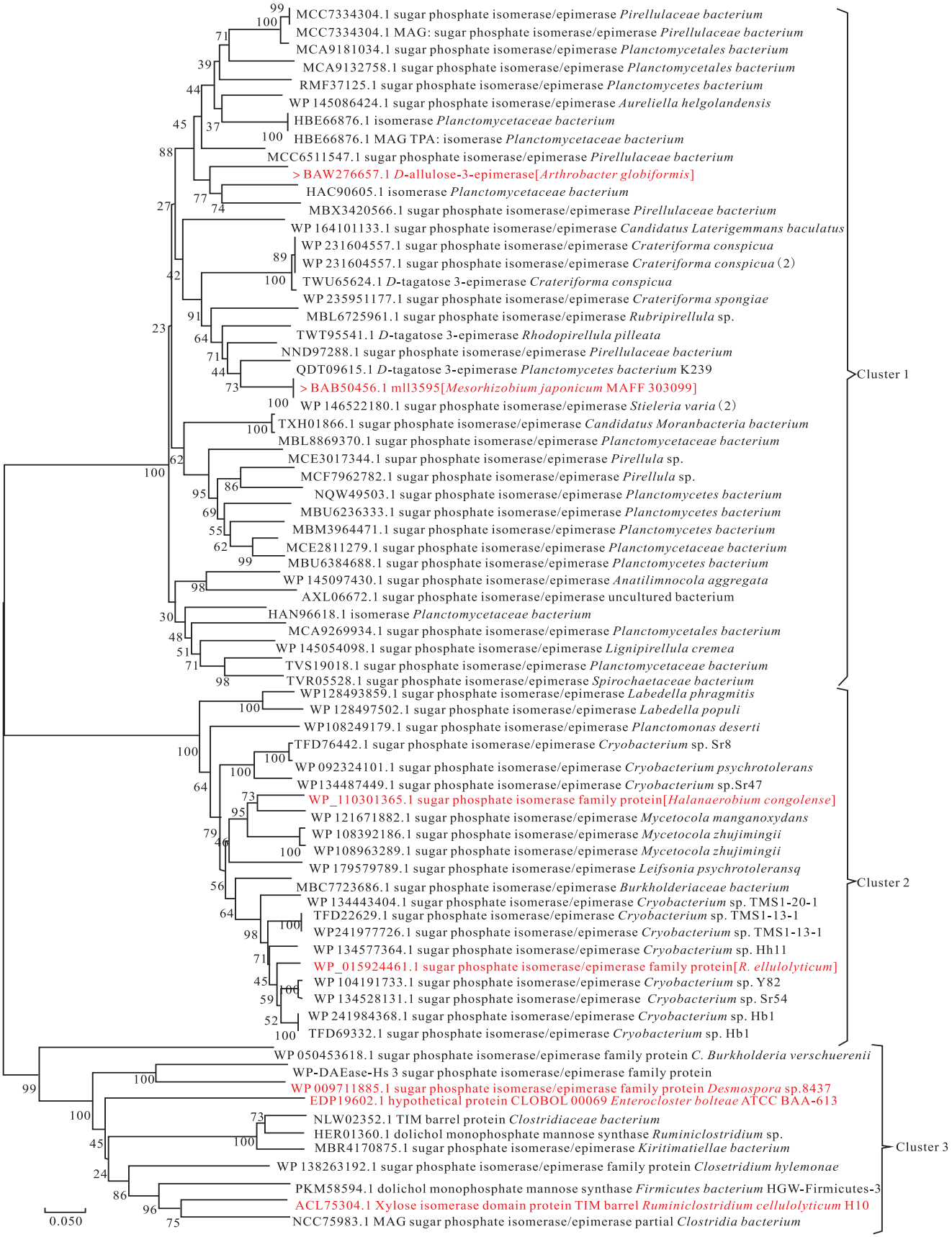
为进一步根据蛋白质结构预测催化功能,需对候选序列进行同源建模,建模的准确性对预测精度产生较大影响。由于 Cluster 3 中的序列与模板(PDB:3VNK)的相似度较高,有助于提高建模准确性,选取 Cluster 3 中的 8 条候选序列进行同源建模。分别从建模评分(Swiss-Model 软件,评分 > 0.8)、Cα二面角(PROCHECK 软件,评分 > 90)和氨基酸序列相容性(Verify3D 软件,评分 > 80)3 个方面对候选序列同源建模质量进行评估,发现候选序列中 Ch-DAEase、Cba-DAEase、Fbh-DAEase、Kb-DAEase 和 Rsp-DAEase 模型质量达到标准,可开展进一步分析。

2.1.3　候选 DAEase 序列的催化机理分析

将阳性对照(Cc-DAEase)与 Ch-DAEase、Cba-DAEase、Fbh-DAEase、Kb-DAEase 和 Rsp-DAEase 的 3D 模型导入 Discovery Studio 软件中。将配体 *D*–果糖 3D 化后与上述 DAEase 模型进行分子对接,评分结果分别为 89.62、88.33、94.28、92.53、96.89,均达到最低评分要求(80 分)。活性中心的关键氨基酸残基与底物的相互作用关系如图 3 所示。根据文献报道,G106、E150、E155、H186、E244 对 DAEase 的催化活性和结构稳定性起着关键作用[14]。Ch-DAEase、Cba-DAEase、Fbh-DAEase、Kb-DAEase 和 Rsp-DAEase 的关键氨基酸个数分别为 3、4、5、4、2 个,其中 Fbh-DAEase 的关键氨基酸残基数量最多,与阳性对照(Cc-DAEase)一致,而 Rsp-DAEase 的最少,不利于发挥 DAEase 催化功能。

底物与活性中心氨基酸形成的氢键个数有助于酶与底物之间的特异性识别,能够增强底物与酶结合的稳定性。Ch-DAEase、Cba-DAEase、Fbh-DAEase、Kb-DAEase 和 Rsp-DAEase 的氢键个数分别为 6、5、7、9、6 个,阳性对照(Cc-DAEase)的氢键个数为 7 个,其中 Fbh-DAEase 和 Kb-DAEase 的氢键个数均不低于 Cc-DAEase 的,有利于与底物的特异性识别,增强结合的稳定性。

DAEase 中的两个 Glu 残基(E150 和 E244)是关键催化残基,其中一个 Glu 残基首先从底物(如 *D*–果糖)的 C-3 位置去除一个质子,生成 cis-enediolate 中间体,随后在对侧的另一个 Glu 残基将 C-3 质子化。E150、E244 同时与 C-3 形成相互作用力,在 DAEase 催化作用中至关重要[15-16]。阳性对照(Cc-DAEase)上



注：红色代表已报道的 DAEase 序列，黑色代表利用模板探针从 NCBI 数据库中筛选获得的 DAEase 候选序列。

图 2　DAEase 候选序列系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree of DAEase candidates

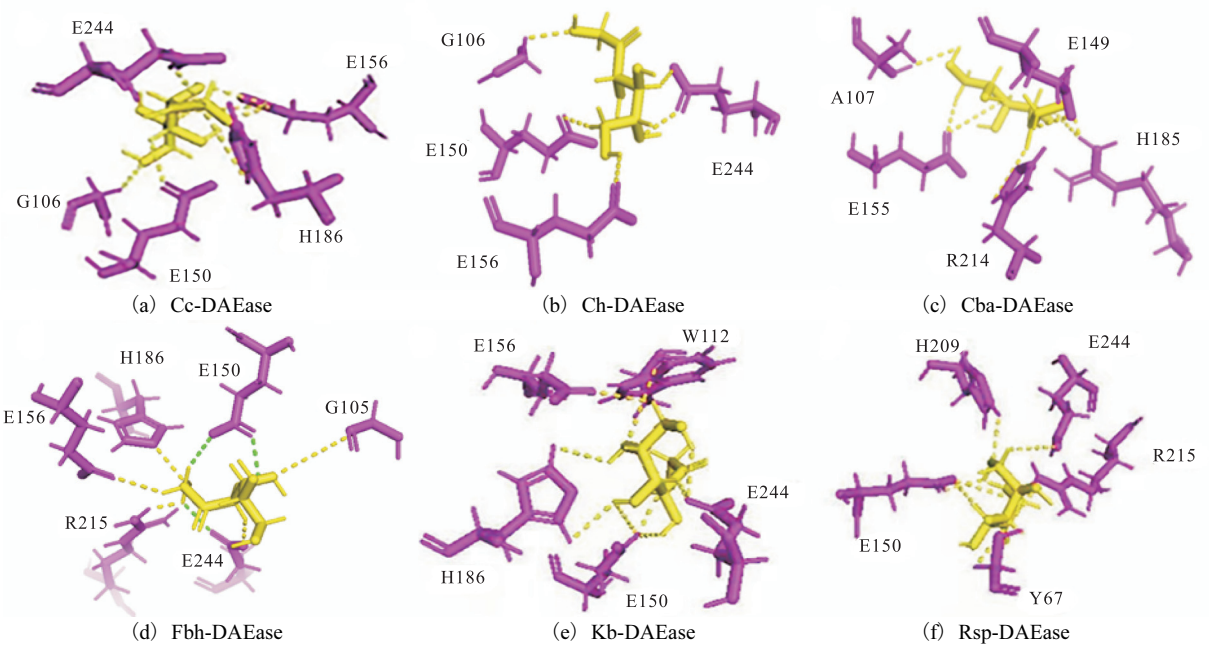


图 3　活性中心关键氨基酸残基与底物的作用关系

Fig. 3　Activity centers of key amino acid residues in relation to substrate action

的 E150、E244 能够与 C-3 位置上形成相互作用力〔图 3(a)〕，有利于 C-3 位置上的质子交换。Fbh-DAEase、Kb-DAEase 与 Cc-DAEase 相似，也满足 C-3 质子交换条件。

2.1.4　DAEase 候选序列的综合评价

基于候选序列的结构和功能对 3 条探针序列与 5 条候选序列进行综合评价，结果见表 1。总分(*Z*)综合考虑了分子对接质量、关键氨基酸数量、底物氢键数量以及 E150、E244 与底物 C-3 的相互作用。关键氨基酸数量越多，与模板活性中心的结构越接近，越有利于反应的发生；底物氢键数量越多，越有利于底物在反应口袋中的稳定性；E150、E244 与 C-3 相互作用则是底物能否发生 C-3 位差向异构反应的关键。按此方法分析 3 条已报道的模板 DAEase 序列(Cb-DAEase、Dsp-DAEase、Cc-DAEase)，发现其建模质量、Cα二面角合理性、氨基酸相容性以及分子对接的评分均超过阈值，且总分较高(88～93 分)，最高分为 Cc-DAEase，达到 92.74 分；5 条功能未知的候选序列中，Fbh-DAEase 的总分数最高，与 Kb-DAEase 相近，与模板序列评分差异较小，具备较高的反应可能性；其余 3 种 DAEase 候选序列总分远低于模板序列，具备反应活性的可能性较低。

表 1　DAEase 候选序列功能预测评分表

Tab. 1　Evaluation of predicted catalytic function of DAEase candidates

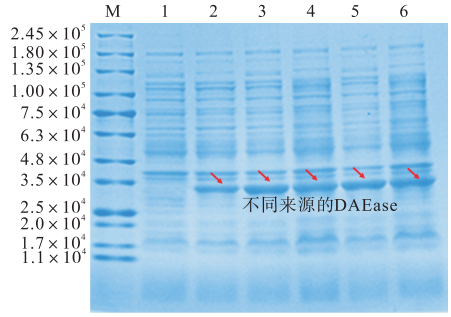
参考因素	Cb-DAEase	Dsp-DAEase	Cc-DAEase	Fbh-DAEase	Ch-DAEase	Cba-DAEase	Kb-DAEase	Rsp-DAEase	阈值
同源建模质量评分	0.83	0.82	0.86	0.84	0.82	0.85	0.83	0.83	0.80
Cα二面角合理性	93.27	93.81	92.31	93.78	94.32	93.54	91.59	92.47	90.00
氨基酸相容性评估	81.59	82.49	84.57	84.57	85.15	84.26	83.47	83.47	80.00
分子对接评分(*H*)	97.80	93.36	99.36	94.28	89.62	88.33	90.53	96.89	80.00
关键氨基酸数量(*J*)[a]	5	4	5	5	3	4	4	2	—
底物氢键数量(*L*)[b]	6	8	7	7	6	5	9	6	—
E150、E244 与底物 C-3 的相互作用(*M*)[c]	1	1	1	1	0	0	1	0	—
总分(*Z*)[d]	89.12	88.34	92.74	90.71	68.85	70.33	90.21	66.76	85.00

注：[a]含有 G106、E150、E155、H186、E244 的数量；[b]指底物 *D*-果糖与氨基酸残基之间的氢键个数；[c]E150、E244 与底物 *D*-果糖的 C-3 位同时存在氢键时记“1”，否则记“0”；[d]$Z = 0.4H+5J+3L+7M$。

2.2　DAEase 候选序列的表达与功能验证

为了验证生物信息学预测的准确性，分别将高评分候选序列 Fbh-DAEase、Kb-DAEase 与低评分候选序列 Ch-DAEase、Rsp-DAEase、Cba-DAEase 进行表达验证，SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析结果如图 4 所示。所有表达候选 DAEase 的重组菌株

经诱导后均产生新的蛋白质条带，与理论大小（3.22 × 10^4 ~ 3.28 × 10^4）相吻合，说明目标蛋白被成功表达。

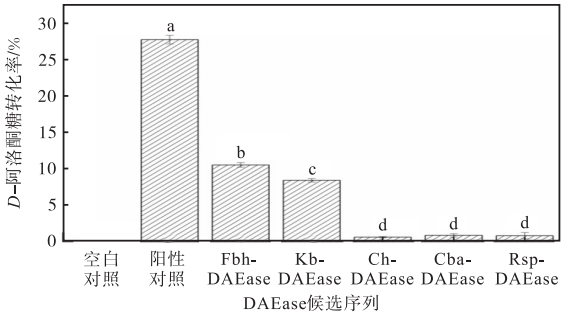


M. Marker；1. 对照（BL21-pET22b）；2. BL21-pET22b-Fbh；3. BL21-pET22b-Ch；4. BL21-pET22b-Cba；5. BL21-pET22b-Kb；6. BL21-pET22b-Rsp

图 4　表达 DAEase 候选序列的重组细胞粗酶液 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　SDS-PAGE electrophoresis of crude enzyme from recombinant cells expressing DAEase candidate sequences

使用粗酶液进行 *D*–果糖的转化反应，验证不同 DAEase 候选序列的催化功能，结果如图 5 所示。生物信息学分析中分数较高的 Fbh-DAEase 和 Kb-DAEase 显示出较强的 *D*–阿洛酮糖转化能力，反应 0.5 h 后 *D*–阿洛酮糖转化率分别为 10.56% 和 8.45%。阳性对照（Cc-DAEase）转化率为 28.86%，而分数较低的 Ch-DAEase、Cba-DAEase 和 Rsp-DAEase 催化 *D*–果糖转化为 *D*–阿洛酮糖的能力较弱，转化率分别为 0.62%、0.85% 和 0.82%（图 5）。由此可见，生物信息学预测（表 1）与实验结果基本一致，本研究提出的基于“序列–结构–机理”的计算机辅助方法在 DAEase 序列挖掘中具有较高的准确性，可为其他功能蛋白序列的挖掘提供参考。



注：不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图 5　DAEase 候选序列催化 *D*–果糖到 *D*–阿洛酮糖的转化率

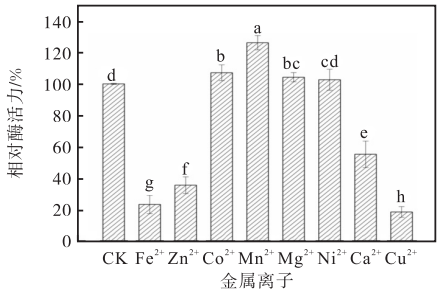
Fig. 5　Conversion rate of *D*-fructose to *D*-allulose catalyzed by DAEase candidates

2.3　Fbh-DAEase 的酶学性质

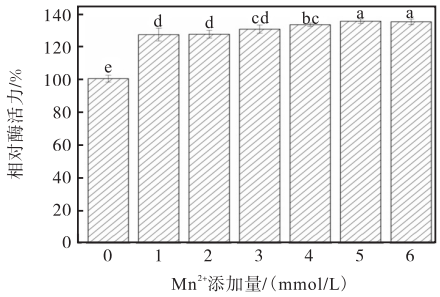
在 5 条候选序列中，Fbh-DAEase 具有最佳的催化活性，且与探针模板 Cc-DAEase、Cb-DAEase 和 Dsp-DAEase 序列一致性分别为 68%、51% 和 52%，具备较大的序列差异，是一种未被报道的新型 DAEase 序列，可以进一步研究其催化功能。

2.3.1　金属离子的种类和添加量对 Fbh-DAEase 酶活力的影响

测试不同金属离子种类及添加量对 Fbh-DAEase 酶活力的影响，结果如图 6 所示。由图 6（a）可知，不添加金属离子（CK）时，Fbh-DAEase 具有较高催化活力，为非金属离子依赖型酶。添加 Co^{2+}、Mn^{2+}、Mg^{2+} 和 Ni^{2+}均可以提高 Fbh-DAEase 催化活性，相对酶活力分别提高 7.23%、26.38%、4.38% 和 3.21%；Fe^{2+}、Zn^{2+}、Ca^{2+}和 Cu^{2+}对 Fbh-DAEase 活性呈现显著抑制作用，相对酶活力分别降低 76.29%、65.51%、44.37% 和 82.04%。



（a）金属离子种类



（b）Mn^{2+}添加量

注：不同小写字母表示组间差异显著（P<0.05）。

图 6　金属离子的种类和 Mn^{2+}添加量对 Fbh-DAEase 酶活力的影响

Fig. 6　Effect of metal ions type and concentration on the relative activity of Fbh-DAEase

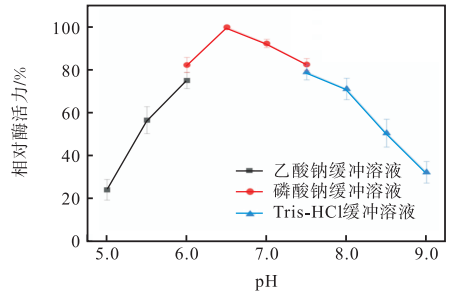
由于反应液中加入 Mn^{2+}对 Fbh-DAEase 酶活力提高最为明显，所以进一步研究 Mn^{2+}添加量对 Fbh-DAEase 酶活力的影响。由图 6（b）可知，Fbh-DAEase 的酶活力随着 Mn^{2+}添加浓度升高而提高，当 Mn^{2+}添加量为 5 mmol/L 时，该酶的相对酶活力达到最高，较未添加 Mn^{2+}时提高 35.43%；当 Mn^{2+}浓度提高到 6 mmol/L 时，Fbh-DAEase 相对酶活力不再增加，酶

与金属离子的结合趋于饱和[17]。

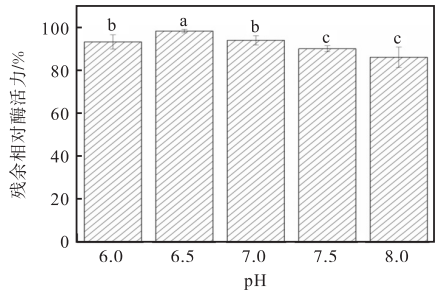
2.3.2　pH 对 Fbh-DAEase 酶活力的影响

为了研究 pH 对 Fbh-DAEase 酶活力的影响，在 55 ℃条件下，采用乙酸钠、磷酸钠和 Tris-HCl 这 3 种缓冲体系，检测 pH 在 5.0 ~ 9.0 范围内的酶活力及稳定性变化，结果如图 7 所示。

由图 7(a)可知，Fbh-DAEase 的酶活力随着 pH 的增加呈现先升高后降低的趋势，最适 pH 为 6.5，在 pH 为 6.0 ~ 7.0 时均显示出较高的催化活性，相对酶活力＞80%。反应 pH 是 *D*–阿洛酮糖生产中需要考虑的重要因素；在碱性条件下，*D*–阿洛酮糖更易与蛋白质发生美拉德反应，非酶促褐变急剧加速，造成产品得率下降；而在弱酸或中性反应条件下，褐变效应和副产物的形成会受到明显的抑制[13]。目前，大多数报道的 *D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶在 pH 为 7.0 ~ 9.0 时显示出较高的催化活性，只有来源于 *Dorea* sp.[18] 的 DAEase 在弱酸性条件下表现出最高酶活力。本研究鉴定的 Fbh-DAEase 最适 pH 为 6.5，是目前除 *Dorea* sp. DAEase 外又一最适 pH 为弱酸性的 DAEase。



(a) 相对酶活力



(b) 稳定性

注：不同小写字母表示组间差异显著（$P<0.05$）。

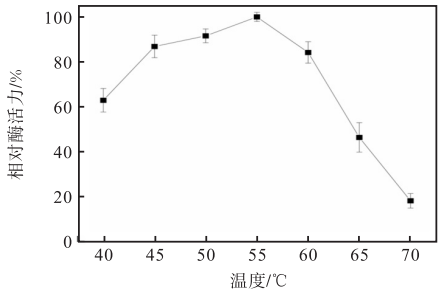
图 7　pH 对 Fbh-DAEase 酶活力及稳定性的影响

Fig. 7　Effect of pH on the catalytic activity and stability of Fbh-DAEase

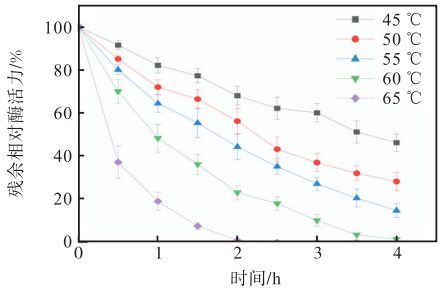
为研究 Fbh-DAEase 的 pH 稳定性，将其在不同 pH 的缓冲液中 4 ℃保温 2 h，测定残余相对酶活力，结果如图 7(b)所示。pH 在 6.0 ~ 7.5 范围时，Fbh-DAEase 酶较稳定，4 ℃放置 2 h 后残余相对酶活力均在 90% 以上；pH 为 6.5 时，Fbh-DAEase 稳定性最佳，4 ℃放置 2 h 后残余相对酶活力保持在 98.39%。

2.3.3　温度对 Fbh-DAEase 酶活力及稳定性的影响

为研究温度对 Fbh-DAEase 酶活力及稳定性的影响，在 pH 6.5 条件下，检测 40 ~ 70 ℃范围内催化活性及稳定性变化，结果如图 8 所示。



(a) 相对酶活力



(b) 稳定性

图 8　温度对 Fbh-DAEase 相对酶活力及稳定性的影响

Fig. 8　Effect of temperature on the enzyme activity and stability of Fbh-DAEase

由图 8(a)可以看出，Fbh-DAEase 的最适反应温度为 55 ℃，在 45 ~ 55 ℃范围均能发挥较高的催化活性，但反应温度达到 60 ~ 70 ℃时催化活性迅速降低。由图 8(b)可知：Fbh-DAEase 耐热性良好，在 45 ~ 50 ℃条件下保温 2 h 后，均能保持 55% 以上的相对酶活力；在 65 ℃稳定性较差，保温 2 h 后催化活性完全丧失。Fbh-DAEase 在 45、50、55、60、65 ℃下的半衰期分别为 3.9、2.3、1.7、1.0、0.3 h。目前在文献报道中，大部分 DAEase 的热稳定性不佳，其中来源于红小梨形菌（*R. baltica*）[19]和根癌农杆菌（*A. tumefaciens*）[20]的 DAEase 在 55 ℃的半衰期约为 1.0 h 和 1.4 h，本研究新发现的 Fbh-DAEase 在 55 ℃的半衰期为 1.7 h，热稳定性较高。

在最适条件下测定 Fbh-DAEase 反应活性，其比活力达到 254.3 U/mg。探针模板序列 Cb-DAEase、

Cc-DAEase、Dsp-DAEase 的比活力分别为 150.7、287.4、252.1 U/mg，本文所构建的 Fbh-DAEase 的比活力在探针序列中仅次于 Cc-DAEase，在 DAEase 家族中处于较高水平。

2.4　*D*–阿洛酮糖的生物转化

为探究 Fbh-DAEase 在最适反应条件下催化 *D*–果糖转化 *D*–阿洛酮糖的能力，在最适反应条件下（55 ℃，pH 6.5，5 mmol/L Mn^{2+}），Fbh-DAEase 催化 *D*–果糖转化为 *D*–阿洛酮糖的时间曲线如图 9 所示。

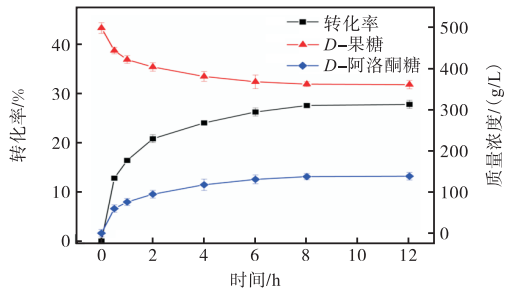


图 9　Fbh-DAEase催化 *D*–果糖转化为 *D*–阿洛酮糖的时间曲线

Fig. 9　Conversion curve of *D*-fructose to *D*-allulose catalyzed by Fbh-DAEase

由图 9 可以看出，Fbh-DAEase 反应 0.5 h 时转化率达到 12.78%，与来源于瘤胃球菌（*Ruminococcus* sp.）[21]的 DAEase 相比，转化率有所提高。在 0.5 ~ 2 h 内转化率上升迅速，反应 2 h 时转化率达到 21.34%；反应 2 ~ 8 h 时转化率增长速率变缓，反应 8 h 时转化率达到最大，为 27.56%，*D*–阿洛酮糖的产量为 137.8 g/L；8 h 后 *D*–阿洛酮糖的转化率趋于稳定。大部分 DAEase 以 *D*–果糖为底物合成 *D*–阿洛酮糖的转化率在 22% ~ 26% [19–23]，少部分 DAEase 转化率在 32% 左右[11–12]。Cc-DAEase 转化率最高可达 32%，其最适反应 pH 为弱碱性，而 *D*–阿洛酮糖在碱性环境下易与蛋白质发生美拉德反应而变色，造成产品的损失。本研究发现的 DAEase 新序列（Fbh-DAEase）转化率达到 27.56%，高于大部分报道的 DAEase 序列，且最适反应 pH 为弱酸性。因此，本研究得到的活性较强、最适 pH 为弱酸性的 Fbh-DAEase 具有一定的研究意义和潜在的应用价值。

3　结　论

本研究基于序列比对、结构模拟、分子对接及活性中心底物与氨基酸残基的相互作用关系开发了一种 DAEase 新序列挖掘方法，该方法逐步淘汰不合格序列，提高了筛选效率，且根据反应机理深入分析候选序列活性中心与底物的相互作用关系，提高了预测的准确性。3 条已报道的 DAEase 序列在此策略中均获得较高的预测评分，通过分子生物学实验对 2 条高分和 3 条低分的未知序列进行表达验证，发现高分序列显示出了明显的 DAEase 催化活性，而低分序列催化活性较低，证明本研究提出的基于“序列–结构–功能”的新序列挖掘策略具有较高的准确度和可靠性。该策略的提出将使酶的新序列挖掘不再仅仅依赖高通量的实验验证，缩短了验证时间，降低了实验成本，大幅度提高了基因序列挖掘效率，对类似研究具有较高参考价值。

应用这一策略，本研究筛选到一种来源于厚壁细菌（*Firmicutes bacterium*）HGW、最适 pH 为弱酸性、活性及温度稳定性良好的 DAEase 家族新成员，以 500 g/L *D*–果糖为底物，可产生 137.8 g/L *D*–阿洛酮糖，转化率达到 27.56%，具有潜在的应用价值。

参考文献：

[1] YUMA T, TOKUDA M, NISHIMOTO N, et al. Allulose for the attenuation of postprandial blood glucose levels in healthy humans : a systematic review and meta-analysis[J]. PLOS ONE, 2023, 18(4): e0281150.

[2] MOLONIA M, SALAMONE F, SPECIALE A, et al. *D*-allulose reduces hypertrophy and endoplasmic reticulum stress induced by palmitic acid in murine 3T3-L1 adipocytes[J]. International journal of molecular sciences, 2024, 25(7): 4059.

[3] HAN Y, YOON J, CHOI M. Tracing the anti-inflammatory mechanism/triggers of *D*-allulose: a profile study of microbiome composition and mrna expression in diet-induced obese mice[J]. Molecular nutrition & food research, 2020, 64(5): 1900982.

[4] 刘梦璐，袁卫涛，李宁，等. 功能性甜味剂 *D*–阿洛酮糖研究进展[J]. 中国食品添加剂，2022，33(1)：21–25.

[5] GUAN L, ZHU L, WANG K, et al. Biochemical characterization, structure-guided mutagenesis, and application of a recombinant *D*-allulose 3-epimerase from *Christensenellaceae bacterium* for the biocatalytic production of *D*-allulose[J]. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 2024, 12: 1365814.

[6] 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 nutri-

tion, 2023, 63(22): 5661–5679.

[7] YOSHIHARA A, KOZAKAI T, SHINTANI T, et al. Purification and characterization of *D*-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a gras microorganism[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2017, 123(2): 170–176.

[8] 张龙涛, 沐万孟, 江波, 等. 生物转化生成 *D*–阿洛酮糖的类球红细菌的筛选[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(9): 40–43.

[9] 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.

[10] 陈佳俊. *D*–阿洛酮糖–3–差向异构酶的性质鉴定及热稳定性改造研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.

[11] SU L, SUN F, LIU Z, et al. Highly efficient production of *Clostridium cellulolyticum* H10 *D*-psicose 3-epimerase in *Bacillus subtilis* and use of these cells to produce *D*-psicose[J]. Microbial cell factories, 2018, 17: 1–10.

[12] WANG H, CHEN J, ZHAO J, et al. Improved thermostability of *D*-allulose 3-epimerase from *Clostridium bolteae* ATCC BAA-613 by proline residue substitution[J]. Protein expression and purification, 2022, 199: 106145.

[13] ZHANG W, FANG D, ZHANG T, et al. Characterization of a metal-dependent *D*-psicose 3-epimerase from a novel strain, *Desmospora* sp. 8437[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2013, 61(47): 11468–11476.

[14] XIE X, TIAN Y, BAN X, et al. Crystal structure of a novel homodimeric *D*-allulose 3-epimerase from a *Clostridia bacterium*[J]. Acta crystallographica section d structural biology, 2022, 78(9): 1180–1191.

[15] LI Z J, FENG L X, CHEN Z, et al. Efficient enzymatic synthesis of *D*-allulose using a novel *D*-allulose-3-epimerase from *Caballeronia insecticola*[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2023, 103(1): 339–348.

[16] JIA D X, SUN C Y, JIN Y T, et al. Properties of *D*-allulose 3-epimerase mined from *Novibacillus thermophilus* and its application to synthesis of *D*-allulose[J]. Enzyme and microbial technology, 2021, 148: 109816.

[17] SUN L D, SUN B B, ZHANG Y L, et al. Kinetic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and inhibition effects of several metal ions on enzymatic activity in vitro and cells[J]. Scientific reports, 2024, 14(1): 5806.

[18] 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.

[19] MAO S, CHENG X, ZHU Z, et al. Engineering a thermostable version of *D*-allulose 3-epimerase from *Rhodopirellula baltica* via site-directed mutagenesis based on B-factors analysis[J]. Enzyme and microbial technology, 2020, 132: 109441.

[20] PARK C, PARK C, SHIN K, et al. Production of *D*-psicose from *D*-fructose by whole recombinant cells with high-level expression of *D*-psicose 3-epimerase from *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of bioscience and bioengineering, 2016, 121(2): 186–190.

[21] 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.

[22] CHEN D, CHEN J, LIU X, et al. Biochemical identification of a hyperthermostable l-ribulose 3-epimerase from *Labedella endophytica* and its application for *D*-allulose bioconversion[J]. International journal of biological macromolecules, 2021, 189: 214–222.

[23] LEE T, SHIN K, OH D. Biotransformation of fructose to allose by a one-pot reaction using *Flavonifractor plautii* *D*-allulose 3-epimerase and *clostridium thermocellum* ribose 5-phosphate isomerase[J]. Journal of microbiology and biotechnology, 2018, 28(3): 418–424.

责任编辑: 郎婧