

基于分子改造手段提高 *D*-来苏糖异构酶 酸性条件异构催化活力

李巧玲 胡 阳 周慧灵 喻 勋 文 李 吴 昊

(长沙理工大学食品与生物工程学院, 湖南 长沙 410114)

摘要: [目的] 改善 *D*-来苏糖异构酶在酸性环境下的活性。[方法] 通过对来源于 *Caldanaerobius polysaccharolyticus* 菌株的 *D*-来苏糖异构酶进行表面残基的溶剂可及表面生物信息学分析, 并设计得到突变位点 K2D、K2E、K8D、K8E、K18D 和 K18E。通过构建突变体, 实现其在大肠杆菌中的重组诱导异源表达, 利用镍离子亲和层析柱分离纯化得到重组突变体酶, 并开展体外重组突变体酶在酸性 pH 5.5 和近中性 pH 6.5 下催化转化 *D*-果糖制备 *D*-甘露糖的差异比较试验。[结果] 重组突变体酶 K8D 和 K8E 显著提升了 *D*-果糖的催化转化率, 最优条件 (pH 6.5) 下的转化率达 140%; 而在 pH 5.5 时, 转化率较野生酶提高了 1.26 倍。[结论] 通过分子改造手段成功提高了 *D*-来苏糖异构酶突变体在酸性条件下的反应活性。

关键词: *D*-甘露糖; *D*-来苏糖异构酶; 分子改造; 生物酶法; 酸稳定性

Enhancing the acidic activity of *D*-lyxose isomerase by molecular modification methods

LI Qiaoling HU Yang ZHOU Huiling YU Xun WEN Li WU Hao

(School of Food Science and Bioengineering, Changsha University of Science & Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

Abstract: [Objective] To improve the activity of *D*-lyxose isomerase under acidic conditions. [Methods] Solvent-accessible surface bioinformatics analysis was performed on surface residues of *D*-lyxose isomerase derived from *Caldanaerobius polysaccharolyticus*, and six mutation sites, *i. e.*, K2D, K2E, K8D, K8E, K18D, and K18E, were designed. Mutants were constructed and subjected to recombinant inducible heterologous expression in *Escherichia coli*. The recombinant mutant enzymes were isolated and purified using a nickel affinity chromatography column. *In vitro* comparative experiments were conducted to evaluate the catalytic conversion of *D*-fructose to *D*-mannose by the recombinant mutant enzymes at acidic pH 5.5 and near-neutral pH 6.5. [Results] The recombinant mutant enzymes K8D and K8E showed significantly improved catalytic conversion rates of *D*-fructose, with the conversion rate reaching 140% under optimal conditions (pH 6.5). At pH 5.5, the conversion rate was 1.26 times higher than that of the wild-type enzyme. [Conclusion] Molecular modification successfully enhanced the catalytic activity of *D*-lyxose isomerase mutants under acidic conditions.

Keywords: *D*-mannose; *D*-lyxose isomerase; molecular modification; biological enzyme method; acid stability

随着经济发展, 人类生活条件得到了较大改善, 但也导致了部分人群糖类摄入过度, 从而提高了糖尿病、肥胖、高脂血症、高血压等慢性病的发病率^[1]。因此, 在保持

口感不变的前提下, 可作为蔗糖替代剂^[2]同时还含有多种对人体有益生理作用的功能性糖逐渐进入大众视野。*D*-甘露糖是一种具有多种用途的功能性糖, 在糖基化蛋

基金项目: 湖南省自然科学基金青年项目 (编号: 2023JJ40018); 国家自然科学基金青年项目 (编号: 32201963); 湖南省科技创新计划资助 (编号: 2023RC3137); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (编号: S202310536041)

通信作者: 吴昊 (1990—), 男, 长沙理工大学副教授, 博士。E-mail: haowu@csust.edu.cn

收稿日期: 2025-01-08 **改回日期:** 2025-03-30

引用格式: 李巧玲, 胡阳, 周慧灵, 等. 基于分子改造手段提高 *D*-来苏糖异构酶酸性条件异构催化活力[J]. 食品与机械, 2025, 41(4): 1-7.

Citation: LI Qiaoling, HU Yang, ZHOU Huiling, et al. Enhancing the acidic activity of *D*-lyxose isomerase by molecular modification methods[J]. Food & Machinery, 2025, 41(4): 1-7.

白的合成和免疫调节中起着至关重要的作用,还可以抑制肿瘤生长、提高化疗疗效^[3],缓解 1 型糖尿病^[4],预防尿路感染^[5],改善肥胖状态^[6],改善先天性糖基化缺陷^[7]。

目前,甘露糖的制备方法主要包括植物提取法、化学合成法、生物酶法以及一些现代技术^[8],如超声波辅助提取和超临界流体提取。与应用最为广泛的植物提取甘露糖法相比,生物酶法具有反应条件温和、环境友好以及成本低等优点^[9]。但在实际生产中,生物酶在工业生产中的酸性环境下活性较低,造成了资源浪费。因此,如何提高酶的酸稳定性使其保证自身催化效率成为 *D*-甘露糖生产制备的研究热点。

表面电荷工程改造是通过改变蛋白质表面氨基酸残基的电荷分布来改变酶的结构和功能特性,主要采用基因工程法和化学修饰法来实现^[10]。基因工程法是利用定点突变技术对编码酶基因进行改造,在特定位点进行酸碱氨基酸替换,以实现酶表面电荷重组,也可以显著提高酶的酸稳定性。Li 等^[11]通过定点突变进行黑曲霉 PNL pelA 的表面电荷设计,使得组合突变体 M6 在 pH 3.0 时的残留活性为 99.8%,提高了黑曲霉 PNL pelA 的耐酸能力;郑微^[12]对野生型葡萄糖异构酶 TEGI 进行了点饱和突变和定点突变,发现葡萄糖异构酶突变体在弱酸性条件下的酶活高于野生型,显著提高了最适 pH 条件下的酶活;陈铭等^[13]通过定点突变得到多个单点和双点 *D*-来苏糖异构酶突变体,该突变体的酸稳定性、催化效率、 K_m 值等相较于野生型均有所提高。而 *D*-来苏糖异构酶的生产环境通常为高温或酸性,会显著降低其稳定性,所以表面电荷工程改造是提高 *D*-来苏糖异构酶酸稳定性的重要手段之一。

试验拟对来源于 *Caldanaerobius polysaccharolyticus* (Capo) 的 *D*-来苏糖异构酶进行同源建模,结合表面残基的溶剂可及表面生物信息学分析,找到 3 个合适的可突变位点 K2、K8、K18,利用定点突变技术对其进行表面电荷突变改造,设计得到 K2D、K2E、K8D、K8E、K18D 和 K18E 等突变体,通过构建突变体,实现其在大肠杆菌中的重组诱导异源表达,利用镍离子亲和层析柱分离纯化得到重组突变体酶,开展体外重组突变体酶催化转化 *D*-果糖制备 *D*-甘露糖的差异比较试验,并分析酸性环境下突变体酶活力的提升机制,以期为其他糖异构酶的酸性分子改造技术提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与主要仪器

1.1.1 材料与试剂

表达载体 pET-22b(+),上游引物、下游引物、 $6\times$ DNA 上样缓冲液、DL10000 DNA Marker、异丙基- β -*D*-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素钠(Amp):上海生工生物工程有限公司;

50 $\times$ TAE 电泳缓冲液:北京索莱宝科技有限公司;

Goldenvue 核酸染料、Phanta Max Super-fidelity DNA Polymerase:南京唯诺赞生物科技股份有限公司;

胰蛋白胨、酵母提取物:美国 Thermo Scientific Oxoid 公司;

质粒小提试剂盒:天根生化科技(北京)有限公司;

蛋白质 Marker、蛋白质 loading buffer、12.5% 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒:上海雅酶生物医药科技有限公司;

BCA 蛋白浓度测定试剂盒:上海碧云天生物技术股份有限公司;

细胞裂解缓冲液:0.05 mol/L PBS, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.0;

上样缓冲液:0.05 mol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 6.5;

清洗缓冲液:0.05 mol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 0.9 mol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 6.5;

洗脱缓冲液:0.05 mol/L PBS, 0.3 mol/L NaCl, 0.3 mol/L 咪唑, 10% 甘油, pH 6.5;

透析缓冲液:0.05 mol/L PBS, pH 6.5。

1.1.2 主要仪器与设备

超声波细胞破碎仪:SCIENTZ-I I D 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

全波长超微量分光光度计:Nano-300 型,美国赛默飞世尔科技公司;

高速台式冷冻离心机:TGL-16 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-5200 型,上海元析仪器有限公司;

梯度 PCR 仪:GM-05 型,杭州晶格科学仪器有限公司;

电泳仪:DYY-6C 型,北京六一生物科技有限公司;

吸收型全波长酶标仪:ReadMax 1900 型,上海闪谱生物科技有限公司;

恒流泵、紫外检测仪:HL-2 型,上海沪西分析仪器厂有限公司;

液相色谱柱:Carbomix Ca-NP10 型,苏州赛分科技有限公司;

高效液相色谱仪:E2695 型,美国沃特世(Waters)公司;

示差折光检测器:2414 型,美国沃特世(Waters)公司。

1.3 试验方法

1.3.1 *C. polysaccharolyticus*-*D*-LIase 重组酶的生物信息学分析 使用 SWISS-Model^[14] (<https://swissmodel.expasy.org/>)对 Capo-*D*-LIase 进行同源建模,利用 PyMol 软件对建模后的 Capo-*D*-LIase 进行可视化分析^[15];利用

GetArea 网站 (<https://curie.utmb.edu/getarea.html>) 分析同源建模后的蛋白质溶剂可及表面区域暴露程度。使用 Clustal 网站对不同来苏糖异构酶进行序列比对、采用 ESPript 3.0 服务器分析得到序列分析图,并分析保守性氨基酸残基。

1.3.2 *C. polysaccharolyticus*-D-Llase 重组酶的单点突变表达载体构建 利用 Snapgene^[16] 软件导入 pET-22b(+) 质粒序列,将 *Capo*-D-Llase 基因序列插入 pET-22b(+) 质粒 NdeI 和 XhoI 酶切位点处,并在基因序列的 C 端插入 6 个组氨酸标签便于酶的纯化。将重组质粒命名为 *Capo*-D-Llase-pET-22b(+),并委托上海生工生物工程有限公司进行重组质粒的合成。使用 Snapgene 软件设计用于构建表达载体的特异性引物,突变体引物具体序列见表 1,以重组 *Capo*-D-Llase-pET-22b(+) 质粒为克隆模板,利用 PCR 反应构建重组载体。

反应体系:模版质粒 1 μ L,正、反引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,dNTP 0.5 μ L,高保真 DNA 聚合酶 0.5 μ L,用 ddH₂O 补足至 25 μ L。程序设置:预变性 95 $^{\circ}$ C,3 min;循环反应(35 cycles):95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 190 s,72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。取 3 μ L PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,确认目标条带大小;向剩余产物中加入 2.0 μ L 10 $\times$ Q.cut Buffer 及 1.0 μ L Q.cut DpnI,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,降解原模板质粒。

表 1 突变位点引物设计结果[†]

Table 1 Results of primer design for mutation sites

突变体名称	引物序列(5'→3')
K2E	F:ACATATG GAA TTTGAGGAATATAAAAAATTACAGG R:ATTCCTCAA ATC CATATGTATATCTCCTTC
K2D	F:ACATATG GAT TTTGAGGAATATAAAAAATTACAGG R:ATTCCTCA AAATC CATATGTATATCTCCTTC
K8E	F:GAGGAATATA AAAGAA TTACAGGAAAAGACGTATG R:CCTGTA ATTC TTTATATTCCTCAAACCTTCATATG
K8D	F:GAGGAATATA AAAGAT TTACAGGAAAAGACGTATG R:CCTGTAA ATCT TTTATATTCCTCAAACCTTCATATG
K18E	F:TACCTT GAAAA AGCAAATATTGTTATAACT R:GCTTT TTCA AAGGTATTCATACGTCTTTTCCT
K18D	F:TACCTT GATAA AGCAAATATTGTTATAACT R:GCTTT ATCA AAGGTATTCATACGTCTTTTCCT

[†] 横线处代表突变位点。

1.3.3 琼脂糖凝胶电泳验证 制备质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶,吸取 3.0 μ L 样品与 0.5 μ L Loading Buffer 混匀后上样,并使用相对分子质量为 10 000 DL 的 DNA Marker 作为标样,120 V 运行 25 min,将凝胶置于成像分析系统中的紫外灯下观察并拍照记录^[17]。

1.3.4 *E. coli* 感受态细胞的制备 在进行重组菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 的构建前,利用 CaCl₂ 热休克法^[18] 制备 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞。取 -80 $^{\circ}$ C 冻存的 *E. coli* DH5 α 与 *E. coli* BL21(DE3) (实验室保藏),冰上解冻后,无菌操作下划线接种于无抗 LB 固体平板,37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~14 h。将上述菌液按 1% 接种量转接至 50 mL LB 培养基(无抗),37 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡培养至 OD_{600 nm} 0.4~0.6(约 2.5 h),冰浴 15 min 终止生长。4 $^{\circ}$ C、3 500 r/min 离心 5 min 收集菌体。用预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液轻柔重悬菌体,冰浴 10 min;4 $^{\circ}$ C、3 500 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次。用预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ -20% 甘油溶液重悬菌体,按每管 100 μ L 分装至预冷 EP 管,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3.5 重组菌 *E. coli* DH5 α 的构建与保存 利用热激法转化转入重组质粒^[19] 构建 *E. coli* DH5 α 。取重组质粒溶液,5 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 50 μ L 无菌水重悬质粒,吹吸混匀。取 100 μ L *E. coli* DH5 α 感受态细胞,冰浴解冻;加入 5 μ L 质粒悬液,轻弹混匀,冰浴 30 min;42 $^{\circ}$ C 热激 90 s,迅速转移至冰浴 5 min;加入 1 mL 无抗 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 复苏培养 1 h。3 800 $\times$ g 离心 3 min 收集菌体,取 100 μ L 涂布于含 Amp 的 LB 平板;37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16 h,筛选阳性克隆。挑取单克隆接种至 4 mL LB 培养基(含 Amp,100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12~14 h;菌液与无菌 50% 甘油按体积比 1:1 混合,分装至 EP 管,-80 $^{\circ}$ C 长期保存(终浓度 25% 甘油)。

1.3.6 重组菌 *E. coli* DH5 α 的质粒抽提与测序 从转化平板中挑取单菌落或从保存的菌液甘油管中吸取 15 μ L 菌液,加入到 15 mL 无菌 Amp 抗性 LB 液体培养基中,恒温震荡过夜培养 12~14 h,使用 TIANGEN 质粒小提试剂盒抽提菌体内部质粒,测定浓度后分装样品送往上海生工生物工程有限公司进行测序,剩余于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.7 重组菌 *E. coli* BL21(DE3) 的构建及重组酶的诱导表达 以 1.3.5 中 *E. coli* DH5 α 的构建方法进行重组菌的构建。挑取转化平板中的单菌落进行过夜培养或吸取 4.5 μ L 甘油保存菌接种至 5 mL LB 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL);37 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡培养 12~14 h(OD_{600 nm} 约为 3.0~4.0)。按体积比 1:50 转接至 200 mL LB 培养基(含 Amp 100 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600 nm} 为 0.6~0.8(约 2~3 h),加入 IPTG 至终浓度 2 mmol/L(原液浓度 1 mol/L,按 2% 体积添加);28 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导培养 6~8 h,将诱导完的菌液于 4 $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清液后将菌体于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.8 重组酶的纯化与透析 将 1.3.7 所得菌体用 25 mL 预冷裂解缓冲液重悬;冰浴条件下超声破碎(325 W 功率,工作 1 s/间隔 2 s,总时长 25 min),4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 5 min,收集上清;上清液过 0.45 μ m 水系滤膜,冰浴保存备

用。镍离子可以与组氨酸的咪唑基形成配位键。基于设计时插入的 6 个组氨酸标签,使用镍离子亲和柱对目标蛋白进行吸附^[20]。固定 Ni-NTA 亲和柱,以 5 倍柱体积(CV)去离子水冲洗残留乙醇;用上样缓冲液冲洗 3 CV 至基线平衡;将粗酶液以低流速通入镍柱,依次用上样缓冲液和清洗缓冲液洗去杂蛋白,最后通入洗脱缓冲液,根据重组酶对应的紫外检测器信号值得到重组酶的纯酶液并置于冰水混合物上。将得到的纯酶液加入到活化、洗净、检漏后的透析袋中,4 ℃透析过夜,得到的纯酶液可在 4 ℃保存 1 周。

1.3.9 SDS-PAGE 测定重组酶单亚基相对分子质量 通过 SDS-PAGE 检测重组来苏糖异构酶的单亚基相对分子质量。SDS-PAGE 胶按照一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒进行制备。取 40 μL 纯酶液与 10 μL 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合,沸水浴变性 10 min,12 000 $\times g$ 离心 5 min,收集上清液作为待测样品。于样品孔中分别加入 10 μL 变性样品及 5 μL 预染蛋白 Marker(10~180 kDa),初始电压为 80 V(浓缩胶阶段),待溴酚蓝迁移至分离胶界面后调整为 120 V 恒压电泳,持续至染料前沿距胶底端约 0.5 cm(总时长约 90 min)电泳结束后,凝胶经考马斯亮蓝 R-250 染色 20 min,转入脱色液。脱色完成后采用凝胶成像系统于白光模式下扫描,Image Lab 软件分析条带相对分子质量。

1.3.10 重组突变体弱酸性条件转化能力的探究 以 BCA 试剂盒测定重组突变体的浓度,突变体酶在两种条件下进行反应,按表 2 配制 pH 为 5.5,6.5 的酶标准反应体系(0.5 mL),并用 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液补齐至 500 μL 。65 ℃反应 30 min,沸水浴 15 min 灭酶。使用高效液相色谱仪和 RID-20A 示差折光检测器进行检测,色谱柱为 Carboxymix Ca-NP10,8% 糖柱,流动相为含 50 mg/L EDTA $\cdot$ Ca 的超纯水,柱温 80 ℃,流速 0.6 mL/min,进样量

10 μL ,流动相在使用前需经 0.22 μm 水系膜抽滤去除杂质和大气泡,并超声脱气 30~60 min 去除小气泡。结束后以甘露糖面积与果糖和甘露糖总吸收峰面积之比计算果糖转化率,再以突变体果糖转化率与野生酶果糖转化率之比计算相对转化率。

表 2 酶标准反应体系[†]

试剂	原始浓度	体积/ μL	终浓度
果糖	1 mol/L	10	0.02 mol/L
Mn ²⁺	0.5 mol/L	5	0.005 mol/L
重组酶	1 mg/mL	100	200 $\mu\text{g/mL}$

[†] 反应体系的 pH 通过 PBS 缓冲液的 pH 进行调整。

1.3.11 数据分析 取 3 次平行试验的平均值,采用 Origin 2024 软件进行数据处理与绘图。

2 结果与分析

2.1 Capo-D-LIase 突变位点设计

利用在线网站 SWISS-MODEL 对 Capo-D-LIase 进行同源建模,选择 GMQE 值最高的来源于 *Thermophilum sp D*-来苏糖异构酶(PDB: 7NZQ)作为建模模版[图 1(a)]。由图 1 可知,有 92.8% 的氨基酸位于完全允许区域,6.6% 的氨基酸位于相对允许区域,可以认为该模型的构象符合立体化学的规则,可以用于后续突变位点分析。

由图 2 可知,经 *D*-来苏糖异构酶同源序列比对分析及 PyMol 可视化分析,碱基 2~20 构成了该酶分子最大的 α -螺旋结构(α -helix A)。 α -螺旋是常见的二级结构,可能参与酶的催化活性、结构稳定性和底物结合。较大的 α -螺旋可能更稳定,或者与其他结构域有更多相互作用,且 α -helix B 比 α -helix C 更短,相比之下,改造 α -helix A 可能会更大程度影响酶活性。由图 3 可知,通过 GetArea 在



(a) Capo-D-LIase 同源建模三维结构图

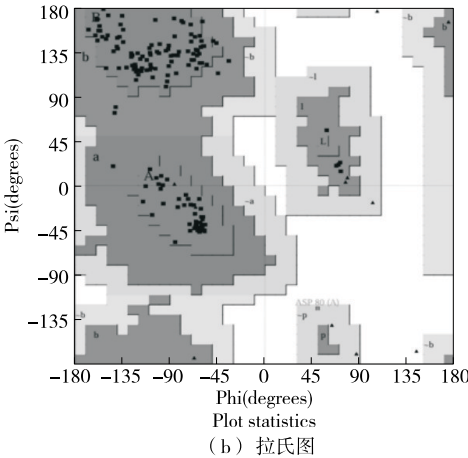


图 1 Capo-D-LIase 的同源建模三维结构图及拉氏图

Figure 1 3D structure diagram of homology modeling of Capo-D-LIase and Ramachandran plot analysis

线服务器分析 *Capo-D-Liase* 表面蛋白质溶剂可及表面区域暴露程度,颜色越深,该氨基酸溶剂可及表面积值越高。改变蛋白质表面电荷会显著影响其理化性质、相互作用及生物学功能,根据酸碱氨基酸置换策略,选择将位

于蛋白质表面且溶剂可及表面积值>50%的带正电荷的非保守性氨基酸突变为带负电荷的谷氨酸和天冬氨酸^[21],设计出6个潜在优良突变体 K2D、K2E、K8D、K8E、K18D 和 K18E。

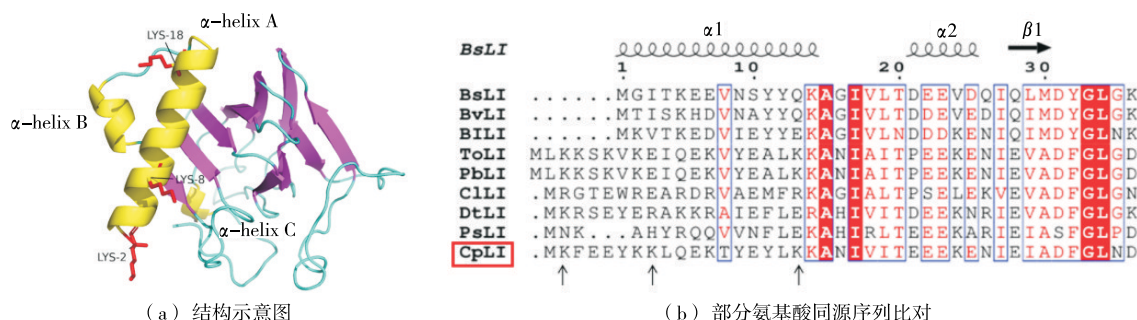
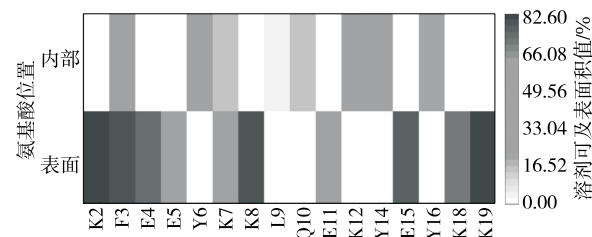


图2 *Capo-D-Liase* 结构示意图及部分氨基酸同源序列比对、保守性分析
黄色为 α -螺旋,紫色为 β -折叠;红色为预选突变位点;黑色箭头表示预选突变位点;红底白字氨基酸为完全保守残基,红字氨基酸和蓝框内氨基酸组为相对保守残基

Figure 2 Structural representation of *Capo-D-Liase* and partial amino acid homology sequence alignment and conservation analysis of *Capo-D-Liase*



Out为该氨基酸位于蛋白质表面;in为该氨基酸位于氨基酸内部

图3 GetArea网站分析结果

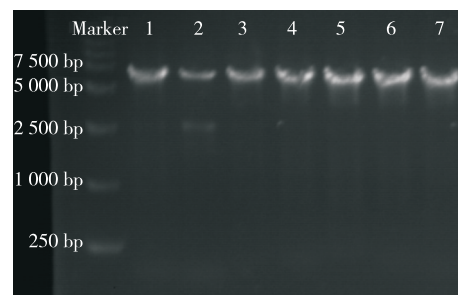
Figure 3 GetArea analysis results

2.2 *Capo-D-Liase* 突变体构建

由图4可知,泳道中仅观察到单一目标条带,未检测到引物二聚体或非特异性扩增产物,初步表明连接反应特异性良好,重组质粒构建成功。为排除PCR假阳性干扰,将重组质粒转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落扩大培养后提取质粒,经Sanger测序验证(见图5),所有位点信号清晰,序列与预期设计完全匹配,表明重组质粒的基因序列正确,满足后续试验要求。将质粒转入到大肠杆菌BL21(DE3)中,加入IPTG诱导表达,使用SDS-PAGE测定相对分子质量,经电泳验证(图6),27 kDa处出现明显条带,与理论相对分子质量相符^[22]。

2.3 单点突变酶在不同pH下的相对转化率

以野生型D-来苏糖异构酶在pH 6.5(最适pH)下的果糖转化率为基准(定义为100%),计算突变体相对转化率。由图7可知,pH 6.5时,多数突变体活性随pH值的升高而增强,K8D、K8E在pH 6.5下的催化效率(140%和127.83%)显著高于野生型(100%),而其他突变体(K2D、



1~7依次为WT、K2D、K2E、K8D、K8E、K18D、K18E

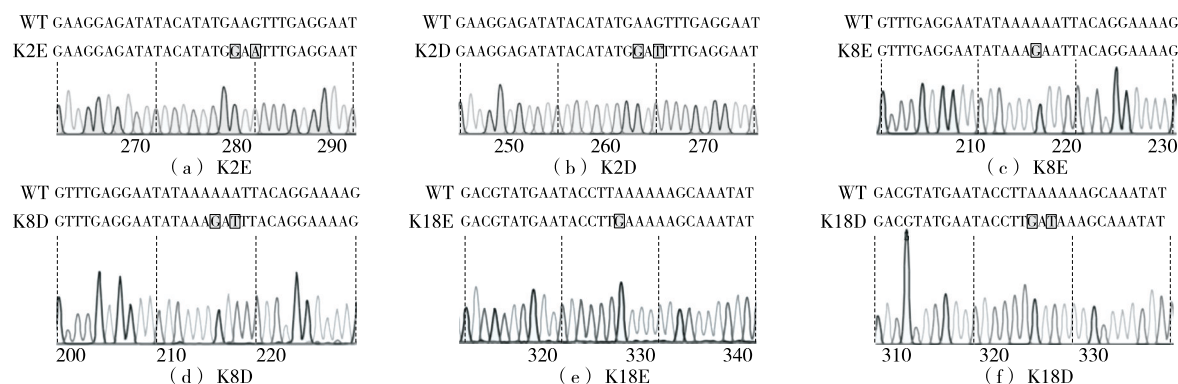
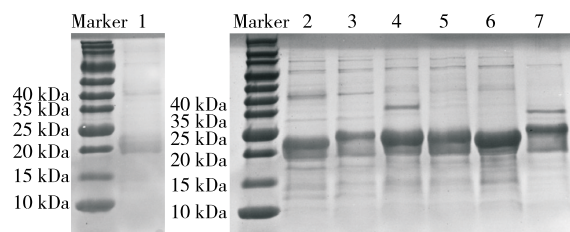
图4 *Capo-D-Liase* 及其突变体的琼脂糖凝胶电泳图

Figure 4 Agarose gel electropherogram of *Capo-D-Liase* and its mutants

K2E、K18D、K18E)的转化率均低于野生型,表明K8位点的电荷修饰对活性提升具有特异性。pH 5.5时,K8E的催化效率较野生型提升了26%,提升约1.26倍,表明K8位点突变(如K8D/K8E)可显著增强酶对弱酸性环境的适应性。

2.4 *Capo-D-Liase* 突变体的酸稳定性提升机制

通过APBS(Adaptive Poisson-Boltzmann Solver)工具计算表面静电势,将正电荷残基替换为负电荷残基后,表面静电势分析(图8)显示,突变后酶分子表面负电荷密度显著增强,其数值由野生型的一65降低至K8D的一69和K8E的一70。低pH下,溶液中H⁺浓度升高,野生酶表面正电荷残基质子化程度增加,导致分子内静电排斥增强,结构松散,突变后,负电荷残基(Asp/Glu)的引入中和了部分正电荷,降低了静电排斥,从而提升了结构稳定性^[23]。

图 5 Capo-D-Liase α -螺旋表面电荷优化突变体的测序验证峰图Figure 5 Sequencing validation peak maps of α -helix surface charge optimized mutants of the Capo-D-Liase

1~7 依次为 WT、K2D、K2E、K8D、K8E、K18D、K18E

图 6 Capo-D-Liase 及其突变体 SDS-PAGE 电泳

Figure 6 SDS-PAGE of Capo-D-Liase and its mutants

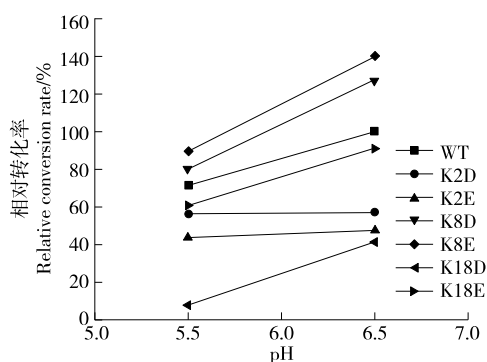
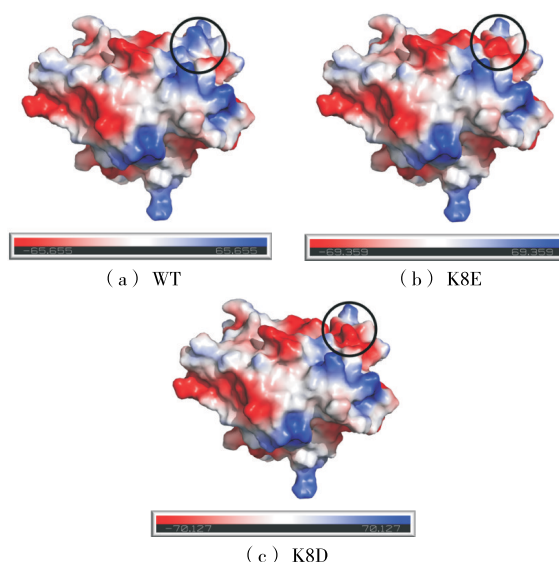


图 7 6 种突变体和 WT 在 pH 5.5、6.5 下的相对转化率

Figure 7 Relative conversion rates of the six mutants and WT under pH 5.5 and pH 6.5

3 结论

基于生物信息学分析,通过同源建模与多序列比对和表面溶剂可及性分析,筛选出 *Caldanaerobius polysaccharolyticus* D-来苏糖异构酶的 3 个关键候选突变位点(K2、K8、K18),并利用酸碱氨基酸置换策略设计了 6 个有优化可能的突变体。结果表明,部分突变体在 pH 5.5 下的相对转化率显著提升,最优突变体(如 K8E)酶活性较野生型提高了 1.26 倍,可能是由于表面电荷改变使分子与周围环境之间的静电斥力发生改变,从而影响了其在酸性条件下的果糖转化率。后续研究可通过整合分



红色为负电荷,蓝色为正电荷

图 8 Capo-D-Liase 及其突变体静电分布图

Figure 8 Electrostatic distribution map of Capo-D-Liase and its mutants (red represents negative charge and blue represents positive charge)

子动力学模拟与构象自由能计算,解析突变体在酸性环境下的动态构象变化规律,揭示突变引起的构象动态变化与质子耐受性关联规律,构建双点突变体进一步改造 *Caldanaerobius polysaccharolyticus* D-来苏糖异构酶在酸性条件下的活性与转化率。

参考文献

- [1] SMITH A, AVERY A, FORD R, et al. Rare sugars: metabolic impacts and mechanisms of action: a scoping review[J]. British Journal of Nutrition, 2022, 128(3): 389-406.
- [2] 王永俊, 邓雯婷, 郑建仙, 等. 4 种功能性低聚糖对海绵蛋糕的面糊性能和烘焙品质的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 8-13.

WANG Y J, DENG W T, ZHENG J X, et al. Effects of four

- kinds of functional oligosaccharides on the batter and the baking quality of sponge cake[J]. Food & Machinery, 2019, 35(5): 8-13.
- [3] GONZALEZ P S, O'PREY J, CARDACI S, et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy[J]. Nature, 2018, 563(7 733): 719-723.
- [4] ZHANG D F, CHIA C, JIAO X, et al. D-mannose induces regulatory T cells and suppresses immunopathology[J]. Nature Medicine, 2017, 23(9): 1 036-1 045.
- [5] LENGGER S M, BRADLEY M S, THOMAS D A, et al. D-mannose vs other agents for recurrent urinary tract infection prevention in adult women: a systematic review and meta-analysis[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2020, 223(2): 265.
- [6] SHARMA V, SMOLIN J, NAYAK J, et al. Mannose alters gut microbiome, prevents diet-induced obesity, and improves host metabolism[J]. Cell Reports, 2018, 24(12): 3 087-3 098.
- [7] DE GRAEF D, MOUSA J, WABERSKI M B, et al. Mannose treatment improves immune deficiency in mannose phosphate isomerase-congenital disorder of glycosylation: case report and review of literature[J]. Therapeutic Advances in Rare Disease, 2022, 3: 26330040221091283.
- [8] WU H, ZHANG W L, MU W M. Recent studies on the biological production of D-mannose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(21/22): 8 753-8 761.
- [9] 胡兴, 张涛, 沐万孟, 等. D-甘露糖异构酶的克隆表达及酶法制备D-甘露糖[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(4): 58-63.
- HU X, ZHANG T, MU W M, et al. Cloning and expression of D-mannose isomerase from *Escherichia coli* BL21 and its application for D-mannose production[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2019, 38(4): 58-63.
- [10] PEDERSEN J N, ZHOU Y, GUO Z, et al. Genetic and chemical approaches for surface charge engineering of enzymes and their applicability in biocatalysis: a review[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2019, 116(7): 1 795-1 812.
- [11] LI Y Y, ZHANG H Y, FU Y S, et al. Enhancing acid resistance of *Aspergillus niger* pectin lyase through surface charge design for improved application in juice clarification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(20): 11 652-11 662.
- [12] 郑微. 葡萄糖异构酶的分子改造及其在高果糖浆生产中的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015: 48.
- ZHENG W. Molecular modification of glucose isomerase and its application in biosynthesis of high fructose corn syrup[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2015: 48.
- [13] 陈铭, 吴昊, 张文立, 等. 弱酸特性D-来苏糖异构酶分子改造及D-甘露糖生产[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 129-137.
- CHEN M, WU H, ZHANG W L, et al. Molecular modification of D-lyxose isomerase with weak acid characteristic and D-mannose production[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 129-137.
- [14] 钟斌, 余思, 陈微, 等. 耐盐芽孢杆菌R1高效壳聚糖酶异源表达及特性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(9): 10-19.
- ZHONG B, YU S, CHEN W, et al. Heterologous expression and characterization analysis of a high-efficiency chitosanase from *Bacillus halotolerans* R1[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(9): 10-19.
- [15] 倪哈滕, 胡孟凯, 张恒维, 等. 半理性设计提高甲酸脱氢酶(CbFDH)活力及热稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(10): 1-8.
- NI H M, HU M K, ZHANG H W, et al. Enhanced activity and thermal stability of formate dehydrogenase (CbFDH) via semi-rational design[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(10): 1-8.
- [16] 张新宇, 高燕宁. PCR引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18, 46.
- ZHANG X Y, GAO Y N. To design PCR primers with oligo 6 and primer premier 5[J]. Bioinformatics, 2004, 2(4): 15-18, 46.
- [17] CHEN Z W, CHEN J J, ZHANG W L, et al. Improving thermostability and catalytic behavior of l-rhamnose isomerase from *Caldicellulosiruptor obsidiansis* OB47 toward d-Allulose by site-directed mutagenesis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(45): 12 017-12 024.
- [18] 赵峰, 张颖, 李慧, 等. 3种假单胞菌CaCl₂法感受态细胞制备及转化条件[J]. 应用生态学报, 2013, 24(3): 788-794.
- ZHAO F, ZHANG Y, LI H, et al. CaCl₂-heat shock preparation of competent cells of three *Pseudomonas* strains and related transformation conditions[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(3): 788-794.
- [19] BADALYAN M, ALOYAN T, AMIRKHANYAN T, et al. Efficacy of genetic transformation of *E. coli* field and reference (ATCC 8739) strains at different concentrations of CaCl₂ for creation of gene libraries[J]. BIO Web of Conferences, 2023, 71: 01082.
- [20] ZAMOJC K, WYRZYKOWSKI D, SABATINO G, et al. Key role of histidine residues orientation in affinity binding of model pentapeptides with Ni²⁺ ions: a theoretical supported experimental study[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 341: 117414.
- [21] XU Z, LI S, FENG X H, et al. Function of aspartic acid residues in optimum pH control of L-arabinose isomerase from *Lactobacillus fermentum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(9): 3 987-3 996.
- [22] WU H, CHEN M, GUANG C E, et al. Characterization of a recombinant D-mannose-producing D-lyxose isomerase from *Caldanaerobius polysaccharolyticus*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 138: 109553.
- [23] LI L, ZHANG Q 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): 16 298-16 306.