

研究报告

嗜热新芽孢杆菌来源 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的高效表达和酶学性质

张苍萍¹, 李延啸^{2,3}, 杨绍青¹, 闫巧娟^{2,4}, 江正强^{*1,3}

1 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083

2 中国农业大学 工学院, 北京 100083

3 中原食品实验室, 河南 漯河 462000

4 南京财经大学 食品科学与工程学院 江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心, 江苏 南京 210023

张苍萍, 李延啸, 杨绍青, 闫巧娟, 江正强. 嗜热新芽孢杆菌来源 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的高效表达和酶学性质[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3551-3561.

ZHANG Cangping, LI Yanxiao, YANG Shaoqing, YAN Qiaojuan, JIANG Zhengqiang. Efficient expression and characterization of D-allulose 3-epimerase from *Novibacillus thermophilus*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3551-3561.

摘要: 【背景】D-阿洛酮糖具有高甜度、低热量的特性, 是一种优良的代糖产品。D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DPEase)可以催化 D-果糖异构化生成 D-阿洛酮糖, 是酶法制备 D-阿洛酮糖中的关键酶。【目的】为提高 DPEase 的工业应用潜力, 对其进行异源表达, 并研究其酶学性质。【方法】利用甘油醛三磷酸脱氢酶启动子将嗜热新芽孢杆菌(*Novibacillus thermophilus*)来源的 DPEase (*NtDPEase*)在毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中组成型表达, 并系统研究该酶的酶学性质。【结果】重组菌在 5 L 发酵罐中经 108 h 高密度发酵, 酶活最高为 201.3 U/mL。经过纯化得到电泳纯 DPEase, 分子量为 35 kDa。该酶的最适 pH 值为 7.0, 最适温度为 60 °C, 在 pH 6.0–8.0 和 45 °C 以下具有良好的稳定性。该酶用于转化不同浓度 D-果糖(100–500 g/L)制备 D-阿洛酮糖, 最高转化率达 29.0%。【结论】本研究实现了 DPEase 在毕赤酵母中的高效表达, 为 D-阿洛酮糖的酶法合成提供了理论和实践依据。

关键词: D-阿洛酮糖 3-差向异构酶; 嗜热新芽孢杆菌; 组成型表达; 酶学性质

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2104900)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2104900).

*Corresponding author. E-mail: zhqjiang@cau.edu.cn

Received: 2024-01-10; Accepted: 2024-03-31; Published online: 2024-04-28

Efficient expression and characterization of D-allulose 3-epimerase from *Novibacillus thermophilus*

ZHANG Cangping¹, LI Yanxiao^{2,3}, YANG Shaoqing¹, YAN Qiaojuan^{2,4},
JIANG Zhengqiang^{*1,3}

1 College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2 College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

3 Food Laboratory of Zhongyuan, Luohe 462000, Henan, China

4 College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Collaborative Innovation Center for Modern Grain Circulation and Safety, Nanjing 210023, Jiangsu, China

Abstract: **[Background]** D-allulose is an excellent sugar substitute with high sweetness and low calories. D-allulose 3-epimerase (DPEase) catalyzes the epimerization of D-fructose to produce D-allulose, being an essential enzyme in the enzymatic production of D-allulose. **[Objective]** To improve the potential of DPEase for industrial application, we realized heterologous expression of this enzyme and characterized the enzymatic properties. **[Methods]** A DPEase (*NtDPEase*) from *Novibacillus thermophilus* was expressed in *Komagataella phaffii* under the regulation of the glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAP) constitutive promoter. The enzymatic properties of the recombinant protein were then characterized. **[Results]** The transformant was incubated in a 5 L fermenter for high cell density fermentation (108 h), with the highest enzyme activity of 201.3 U/mL. The recombinant enzyme was purified to reach the electrophoretic purity, with a molecular weight of 35 kDa. This enzyme showed the best performance at pH 7.0 and 60 °C and good stability within the ranges of pH 6.0–8.0 and temperatures below 45 °C. Furthermore, the enzyme was used to convert D-fructose with different concentrations (100–500 g/L) to produce D-allulose, which scored the highest conversion rate of 29.0%. **[Conclusion]** This study achieves the efficient expression of *NtDPEase* in *K. phaffii* for the first time, providing a theoretical and practical basis for the enzymatic production of D-allulose.

Keywords: D-allulose 3-epimerase; *Novibacillus thermophilus*; constitutive expression; characterization

D-阿洛酮糖(D-allulose)是一种低热量(0.4 cal/g)稀有糖,甜度为蔗糖的70%,主要用作食品配料和膳食补充剂^[1],具有降低糖尿病患病率、抗氧化、消炎等多种生理功能^[2]。2014年美国食品药品监督管理局认证D-阿洛酮糖为“一般认为安全的(generally recognized as safe, GRAS)”(GRN No. 498),并批准其在食品及膳食补充剂中的应用^[3]。D-阿洛酮糖的制备方法包括

植物提取、化学合成、酶法合成等^[4-6]。酶法合成是以D-果糖为底物经D-阿洛酮糖3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DPEase)异构化为D-阿洛酮糖,具有安全、高效、无污染等优点,是目前生产D-阿洛酮糖最主要的方法。2006年首次报道从根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中克隆表达一种以D-阿洛酮糖为最适底物的D-阿洛酮糖3-差向异构酶(DPEase)^[7]。

此后,从解纤维素梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)^[8]、普氏解黄酮菌(*Flavonifractor plautii*)^[9]、盲肠热梭菌(*Thermoclostridium caenicola*)^[10]等多种微生物中克隆和表达了 DPEase。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[7,11]和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[12]广泛用于 DPEase 的异源表达。酵母表达系统遗传稳定性高,发酵工艺成熟,能够高水平表达异源蛋白,也是一种广泛应用的表达系统。以甲醇诱导的醇氧化酶启动子 AOX1 是毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中应用最广泛的启动子。Wang 等^[13]通过 AOX1 启动子的调控在毕赤酵母中诱导表达 α -淀粉酶。但是 AOX1 启动子在高密度发酵过程中需要添加甲醇诱导,所以一些安全高效的启动子被发现和应用^[14]。甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子(P_{GAP})作为一种强组成型启动子^[15],用于多种异源蛋白的组成型表达。Huang 等^[16]利用 AOX1 启动子在毕赤酵母中分泌表达透明质酸酶,进一步使用组成型启动子甘油醛三磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAP)的突变体 GAP_(m)^[17]在毕赤酵母中实现了目的蛋白的高效、安全生产。Nisha 等^[18]分别使用 AOX1 和 GAP 启动子调控淀粉普鲁兰酶在毕赤酵母中的表达,结果该基因在 GAP 启动子调控下具有更高的表达量。DPEase 在酵母中表达的研究很少,根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)来源的 DPEase 在马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)中表达^[19]。目前,尚无 DPEase 在毕赤酵母(*Komagataella phaffii*)中表达的报道。

本研究利用 GAP 启动子实现嗜热新芽孢杆菌(*Novibacillus thermophilus*)来源的 DPEase (*NtDPEase*)在毕赤酵母中的组成型表达,进一步研究了重组酶的酶学性质及其在合成 D-阿洛酮糖中的应用。

1 材料与方法

1.1 样品

嗜热新芽孢杆菌来源的 DPEase 基因(*NtDPEase*, GenBank 登录号为 WP_077721022.1)由北京擎科生物科技有限公司合成。引物 *NtDPE1022-F* 和 *NtDPE1022-R* 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。毕赤酵母 GS115,北京全式金生物科技有限公司;酵母组成型表达载体 pGAPZ(α)A,武汉淼灵生物科技有限公司;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,北京博迈德基因技术有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

低盐 LB 液体培养基、酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)液体培养基、低盐 LB (LBZ)固体培养基和含山梨醇的 YPD 培养基(yeast extract peptone dextrose medium containing sorbitol, YPDS)固体培养基参照文献[16]配制。

Fast Pfu DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司; ClonExpress II One Step Cloning Kit,南京诺唯赞生物医药科技有限公司;限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I、*Avr* II、*Endo* H, NEB 公司;质粒提取试剂盒,北京聚合美生物科技有限公司;琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒, Omega Bio-Tek 公司;博来霉素和 D-果糖,北京百瑞极生物科技有限公司;D-阿洛酮糖,上海源叶生物科技有限公司。

电泳仪、PCR 自动扩增仪和电转仪, Bio-Rad 公司;恒温水浴锅,北京长风仪器公司;紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;5 L 发酵罐,上海国强生化工程有限公司;高效液相色谱仪、示差折光检测器, Agilent Technologies 公司。

1.3 组成型重组质粒的构建和在毕赤酵母中的表达

以 pET-28a(+)-*NtDPEase* (北京擎科合成)为模板, *NtDPE1022-F* (5'-AGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGAAATATGGCGTTTATTTTGCC-3', 下划线为 *EcoR* I 酶切位点)和 *NtDPE1022-R* (5'-TGTTCTAGAAAGCTGGCGGCCGCCAGTTCGCCAAATGCCTGTTT-3', 下划线为 *Not* I 酶切位点)为引物通过 PCR 扩增目的基因。PCR 反应体系(50 μ L): 5 \times TransStart *Fast Pfu* Buffer 10 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 30 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, 2.5 U/ μ L *Fast Pfu* DNA 聚合酶 1 μ L, 超纯水补足 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 20 s, 55 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物回收后通过无缝克隆连接至 pGAPZ(α)A 载体, 构建重组表达质粒 pGAPZ(α)A-*NtDPEase*。回收经限制性内切酶 *Avr* II 线性化的重组表达质粒, 并电击转化至毕赤酵母 GS115。收集重组菌株后涂布于含有不同浓度(100、300、500 和 1 000 μ g/mL)博来霉素的 YPDS 固体培养基, 30 $^{\circ}$ C 孵育出单菌落后挑取转化子于 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 发酵 4 d 后测定酶活。

1.4 重组毕赤酵母的高密度发酵

高密度发酵方法参照文献[20]并稍作修改。将筛选得到的阳性转化子接种于 YPD 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 OD_{600} 达 10.0, 接种于 5 L 发酵罐(装液量 1.5 L)进行高密度发酵。发酵过程中流加质量分数为 50%的葡萄糖(含 0.2%组氨酸, 质量体积分数), 转速控制在 500–600 r/min。间隔时间取样测定菌体湿重、蛋白含量和酶活。

1.5 酶活力和蛋白含量的测定

将 50 μ L 适当稀释的酶液加入 450 μ L 底物溶液(50 g/L D-果糖, 1 mmol/L Co^{2+} , 50 mmol/L

磷酸盐缓冲液, pH 7.0)中充分混匀, 60 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后煮沸 10 min 终止反应。用纯水稀释反应物至适宜浓度, 利用高效液相色谱测定生成 D-阿洛酮糖的含量。高效液相色谱条件: Aminex HPX-87C (7.8 mm \times 300 mm, Bio-Rad)色谱柱, 柱温为 85 $^{\circ}$ C, 流动相为纯水, 流速为 0.6 mL/min。在上述条件下, 每分钟产生 1 μ mol/L D-阿洛酮糖所需的酶量, 定义为 1 个酶活力单位(U)。比酶活(U/mg)定义为在上述条件下, 单位重量(mg)蛋白质所具有的酶活力单位数(U)。

参考文献[21]测定蛋白含量, 利用牛血清白蛋白制作标准曲线。

1.6 重组 *NtDPEase* 的纯化及糖基化分析

将高密度获得的发酵液经 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(500 mmol/L NaCl, pH 8.0)中透析(4 $^{\circ}$ C)过夜, 得到粗酶液。将粗酶液上样于 Ni^{2+} -Chelating Sepharose Fast Flow 亲和层析柱, 流速为 0.5 mL/min。用含有 20 mmol/L 咪唑的洗脱液(20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0)洗脱杂蛋白, 再依次利用含有 100 mmol/L 和 200 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱目的蛋白。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检验收集液中目的蛋白的纯度^[22]。利用去糖基化酶 *Endo* H 分析目的蛋白 *N* 糖基化情况, 以未经处理的样品作为对照。

1.7 重组 *NtDPEase* 的酶学性质测定

酶的最适 pH 和 pH 稳定性: 在不同 pH 缓冲体系中按照标准方法测定重组 *NtDPEase* 的酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算不同 pH 下的相对酶活力。所用缓冲液包括柠檬酸缓冲液(pH 5.0–6.0)、磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0–9.0)和甘氨酸-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.0)。酶的 pH 稳定性测定, 用上述缓冲液稀释酶液至适宜浓度, 在 40 $^{\circ}$ C 孵育

30 min 后立即冰浴 30 min, 在最适条件下测定残余酶活力, 以未经处理的酶液为对照(100%)。

酶的最适温度和温度稳定性: 在 30–80 °C 按照标准方法测定重组 *NtDPEase* 的酶活力, 以最高酶活力为 100%, 计算各温度下的相对酶活力。为测定酶的温度稳定性, 用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(50 mmol/L)适当稀释酶液, 在 30–80 °C 范围内孵育 30 min 后立即置于冰中冷却 30 min, 在最适条件下测定残余酶活力, 以未经处理的酶液为对照(100%)。

不同金属离子及化合物对酶的影响: 向反应体系中加入 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 和 EDTA 等 8 种金属离子及化合物(1 mmol/L), 在最适条件下测定相对酶活力, 以未添加任何金属离子及化合物的测定组为对照(100%)。

分别以 D-果糖、D-阿洛酮糖、D-山梨糖、D-塔格糖、L-山梨糖、D-果糖-6-磷酸二钠为底物, 测定重组 *NtDPEase* 的底物特异性。以浓度为 50 g/L 的上述单糖及衍生物为底物, 按照标准方法测定 60 °C 酶活。产物浓度由高效液相色谱测定, 以上述底物及其产物作为标准品。重组 *NtDPEase* 对各底物酶活力的定义均为每分钟转化底物生成 1 $\mu\text{mol/L}$ 相应产物所需要的酶量。以 D-果糖和 D-阿洛酮糖为底物(5–600 mmol/L), 在最适条件下进行酶反应, 通过 Grafit 软件计算酶的反应动力学参数: V_{max} (最大反应速率)、 K_m (米氏常数)、 k_{cat} (催化常数) 和 k_{cat}/K_m (催化效率)。

1.8 重组 *NtDPEase* 转化 D-果糖制备 D-阿洛酮糖

在 60 °C 和 pH 7.0 评价重组 *NtDPEase* 异构化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的能力。分别以 100、300、500 g/L 的 D-果糖作为底物, 添加终浓度为 1 mmol/L 的 Co^{2+} 及 2 $\mu\text{mol/L}$ 重组 *NtDPEase*, 间隔时间(0.25、0.5、1、2、4、6、8 和 12 h)取

样并利用高效液相色谱测定 D-阿洛酮糖生成量, 计算 D-阿洛酮糖的转化率。D-阿洛酮糖的转化率定义为反应达到平衡时生成 D-阿洛酮糖的量(mg/mL)与反应前 D-果糖的量(mg/mL)之比。

2 结果与分析

2.1 *NtDPEase* 在毕赤酵母中组成型表达

嗜热新芽孢杆菌来源的 *DPEase* 基因(*NtDPEase*)在 pGAPZ(α)A 载体的 GAP 启动子调控下实现了在毕赤酵母中的组成型表达。PCR 扩增得到目的基因序列(图 1A), 利用无缝克隆连接 PCR 扩增产物和经 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切的 pGAPZ(α)A 载体, 将测序正确的重组质粒 pGAPZ(α)A-*NtDPEase* 转化毕赤酵母。平板筛选获得一个阳性转化子, 经 SDS-PAGE 验证在 29.0–44.3 kDa 处有条带(图 1B), 摇瓶发酵 4 d 后发酵液上清酶活力达 46.12 U/mL, 表明该酶在毕赤酵母中成功组成型表达。

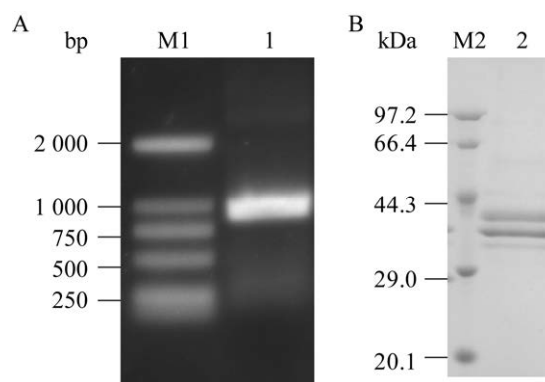


图 1 基因 *NtDPEase* 的 PCR 扩增产物(A)和重组酶 SDS-PAGE 分析(B) M1: DNA Marker; 1: PCR 扩增基因 *NtDPEase* 产物; M2: 低分子量标准蛋白 marker; 2: 重组 *NtDPEase*

Figure 1 PCR amplification of *NtDPEase* (A) and SDS-PAGE analysis of recombinant enzyme (B). M1: DNA Marker; 1: PCR amplification of *NtDPEase*; M2: Low molecular weight standard protein marker; 2: Recombinant *NtDPEase*.

2.2 重组 *NtDPEase* 的高密度发酵和纯化

阳性转化子在 5 L 发酵罐中高密度发酵, 第 108 h 时发酵液中 *DPEase* 酶活力达 201.3 U/mL, 蛋白含量和菌体湿重分别为 1.9 mg/mL 和 271.6 mg/mL (图 2A)。SDS-PAGE 表明, 随着发酵时间的延长, 目的蛋白(约 35 kDa)含量逐渐增加(图 2B)。经亲和层析一步纯化, 获得电泳级纯酶(图 2C)。纯化后的重组 *NtDPEase* 呈两条带, 分子量分别为 35 kDa 和 42 kDa, 略高于该酶的预测分子量 (33 kDa)。经去糖基化酶糖苷内切酶 H (endo- β -N-acetylglucosaminidase H, *Endo H*)处理后, 该

酶呈单一条带, 分子量约为 35 kDa, 表明该酶存在糖基化修饰。利用 NetNGlyc-1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>) 分析重组蛋白潜在的 *N* 糖基化位点, 结果表明其 266–270 位(Asn-Ala-Thr-Glu)可能存在 *N* 糖基化位点。

2.3 重组 *NtDPEase* 的酶学性质

重组 *NtDPEase* 的最适 pH 值为 7.0 (图 3A), 在 pH 6.0–8.0 范围内孵育 30 min 的相对酶活力仍为 70%以上(图 3B)。该酶的最适温度为 60 °C (图 3C), 在 45 °C 以下具有良好的稳定性, 处理

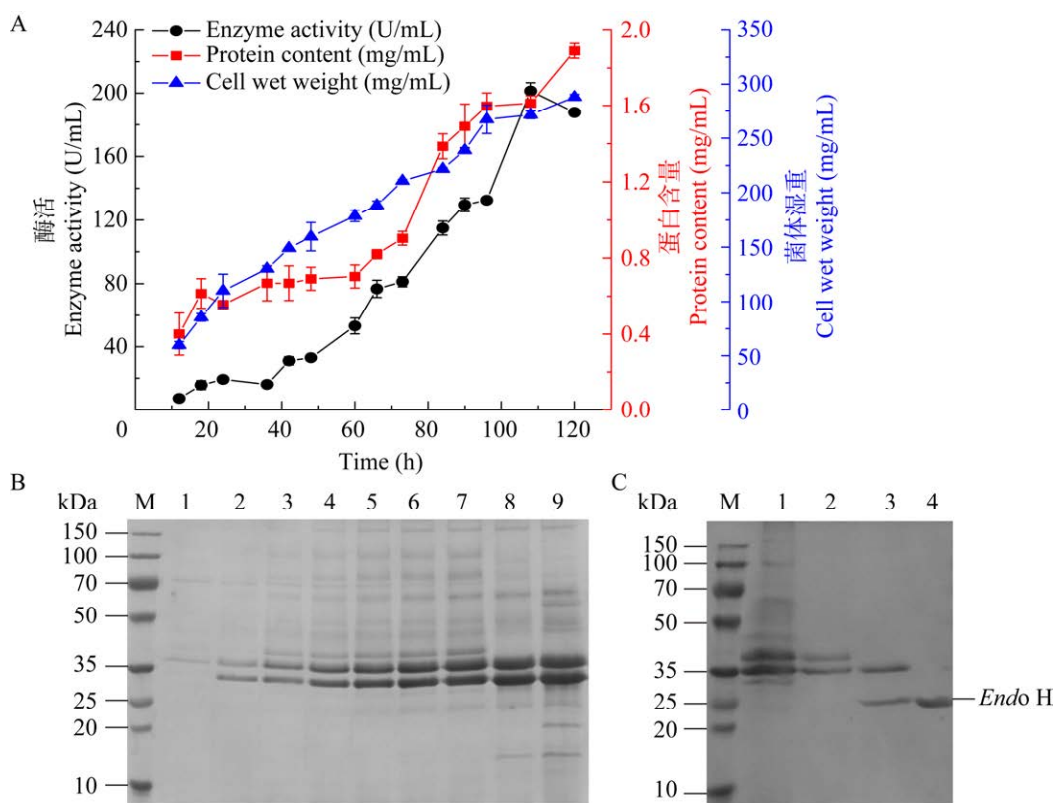


图 2 重组 *NtDPEase* 的高密度发酵和纯化历程 A: 高密度发酵历程. B: 高密度发酵过程分泌蛋白 SDS-PAGE 分析(M: 预染蛋白 Marker; 1–9: 发酵 12、24、36、48、60、72、84、96 和 108 h 的上清液). C: 粗酶液纯化及糖基化分析(M: 预染蛋白 Marker; 1: 粗酶液; 2: 纯酶液; 3: 经去糖基化酶 *Endo H* 处理后的纯酶液; 4: *Endo H*)

Figure 2 High cell density fermentation and purification of recombinant *NtDPEase*. A: High cell density fermentation process. B: SDS-PAGE analysis of secreted proteins during high cell density fermentation (M: Prestained protein marker; 1–9: Fermentation supernatants withdrawn at 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 and 108 h, respectively). C: Crude enzyme purification and glycosylation analysis (M: Prestained protein marker; 1: Crude enzyme solution; 2: Pure enzyme solution; 3: Pure enzyme solution treated with deglycosylation enzyme *Endo H*; 4: *Endo H*).

30 min 后可保留 90% 以上的酶活力(图 3D)。不同金属离子及化合物对重组 *NtDPEase* 酶活力的影响见表 1。 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 显著促进重组 *NtDPEase* 的酶活力, 相对酶活分别为对照组的 124.6% 和 123.9%。相反地, Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 和 EDTA 明显抑制该酶酶活力。重组 *NtDPEase* 的底物特异性见表 2。重组 *NtDPEase* 对 D-阿洛酮糖的催化活性最高(比酶活 298.3 U/mg), 相对酶活力为 158.5%, 其次为 D-果糖, 比酶活为 188.2 U/mg。该酶对其他底物的催化活性较低, 对 D-塔格糖和 D-山梨糖的相对酶活力分别为 8.0% 和 3.4%。该酶对 L-山梨糖和 D-果糖-6-磷酸二钠无催化活性。重组 *NtDPEase* 的动力学常数见表 3, 当以 D-果糖

为底物时, 其 K_m 值为 153.0 mmol/L, 大于以 D-阿洛酮糖为底物时的 K_m (64.5 mmol/L), 表明该酶对阿洛酮糖的亲合性更高。以 D-阿洛酮糖为底物时, 该酶的 k_{cat}/K_m 为 142.0 L/(mmol·min), 大于以果糖为底物时的 44.4 L/(mmol·min), 表明重组 *NtDPEase* 在以 D-阿洛酮糖为底物时催化效率更高。以上结果进一步证明该酶最适底物为 D-阿洛酮糖。

2.4 利用重组 *NtDPEase* 生产 D-阿洛酮糖

重组 *NtDPEase* 转化不同浓度 D-果糖制备 D-阿洛酮糖的反应历程如图 4 所示。以 100、300、和 500 g/L D-果糖为底物时, 反应 8 h 后 D-阿洛酮糖的生成量分别达 28.2、81.9 和 145.0 g/L, D-果糖的转化率分别为 28.2%、27.3% 和 29.0%。

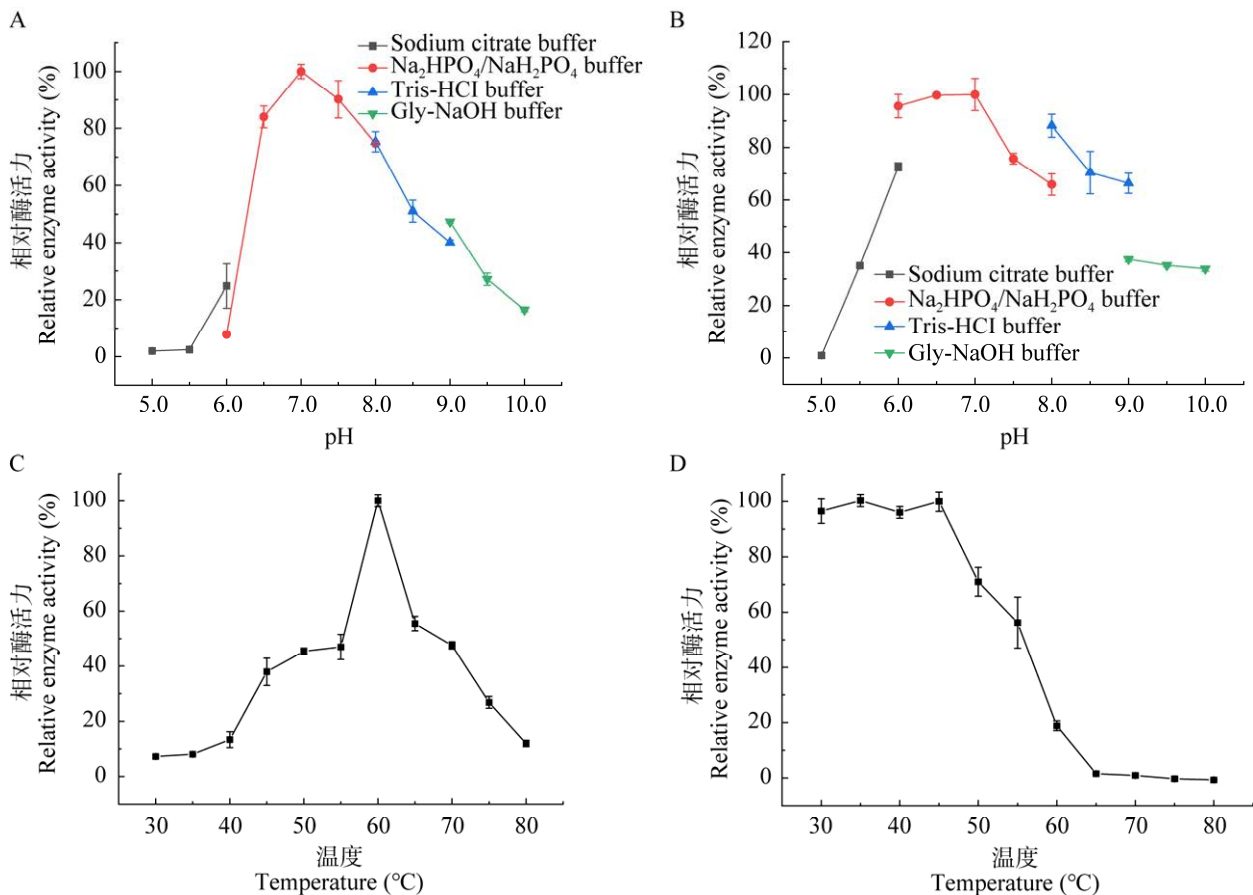


图 3 重组 *NtDPEase* 的最适 pH (A)、pH 稳定性(B)、最适温度(C)和温度稳定性(D)

Figure 3 Optimal pH (A), pH stability (B), optimal temperature (C), and thermostability (D) of recombinant *NtDPEase*.

表1 金属离子及化合物对重组 *NtDPEase* 酶活影响
Table 1 Effect of metal ions and compounds on recombinant *NtDPEase* enzyme activity

金属及化合物 Metal ions and compounds	比酶活 Specific enzyme activity (U/mg)	相对酶活力 Relative enzyme activity (%)
Control	124.4±5.4	100.0
Co ²⁺	155.0±7.3	124.6
Cu ²⁺	13.0±2.3	10.4
Fe ²⁺	63.8±4.7	51.3
Mg ²⁺	127.1±2.3	102.2
Mn ²⁺	154.1±0.7	123.9
Ni ²⁺	53.5±4.2	43.1
Zn ²⁺	71.9±3.3	57.8
EDTA	25.9±2.7	20.8

表2 重组 *NtDPEase* 的底物特异性

Table 2 Substrate specificity of recombinant *NtDPEase*

底物 Substrate	比酶活 Specific enzyme activity (U/mg)	相对酶活力 Relative enzyme activity (%)
D-果糖 D-fructose	188.2±6.2	100.0
D-阿洛酮糖 D-allulose	298.3±6.9	158.5
D-塔格糖 D-tagatose	15.1±1.0	8.0
D-山梨糖 D-sorbose	6.4±1.2	3.4

重组 *NtDPEase* 对 L-山梨糖、D-果糖-6-磷酸二钠没有活性
Recombinant *NtDPEase* has no activity against L-sorbose and D-fructose-6-phosphate disodium.

表3 重组 *NtDPEase* 的动力学常数

Table 3 Kinetic parameters of recombinant *NtDPEase*

底物 Substrate	D-果糖 D-fructose	D-阿洛酮糖 D-allulose
V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$)	193.9±3.3	204.2±2.2
K_m (mmol/L)	153.0±6.8	64.5±2.5
k_{cat} (min^{-1})	6 786.5	9 163.0
k_{cat}/K_m (L/mmol·min)	44.4	142.0

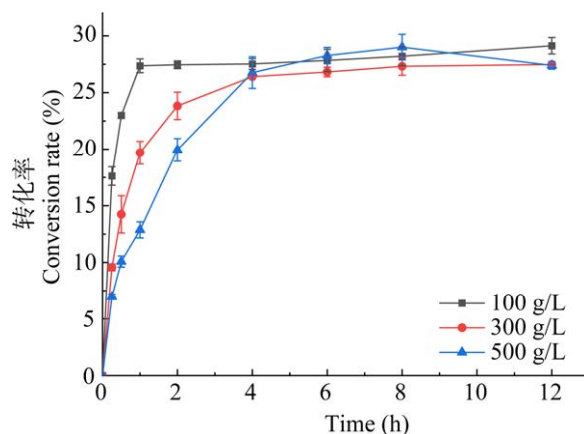


图4 重组 *NtDPEase* 转化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖
Figure 4 Recombinant *NtDPEase* converts D-fructose to D-allulose.

3 讨论与结论

异源表达是提高目的酶产量的有效手段之一, Jia 等^[23]从 NCBI 数据库中挖掘嗜热新芽孢杆菌来源的 DPEase 基因并在大肠杆菌中可溶性异源表达, 重组酶的酶活为 273.9 U/g, 目前尚无该基因在其他宿主中异源表达的报道。本研究中使用 GAP 启动子成功在毕赤酵母中异源表达该基因, 高密度发酵不以甲醇为诱导剂, 发酵过程安全, 在食品工业中具有潜在的应用价值^[15]。Martínez 等^[24]利用 GAP 启动子在毕赤酵母中组成型表达葡聚糖酶。葱腐葡萄孢(*Botrytis aclada*)来源的漆酶在毕赤酵母中分别受 GAP 启动子和 AOX1 启动子调控时表达水平相当, 但使用 GAP 启动子时表达速度更快^[25]。

迄今多种细菌来源的 DPEase 基因已在原核表达系统中成功表达, 在真核表达系统的报道很少^[26-28]。通过与细菌 GroE 伴侣蛋白共表达, 根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)来源的 DPEase 成功在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中表达, 但是其比酶活仅为 0.004 U/mg^[29]。本研究利用组成型毕赤酵母表达 *NtDPEase*, 产酶水平高于大多数 DPEase 在酵母系统中的表达

水平^[29]。

大多数 DPEase 的最适 pH 为弱碱性，在中性及酸性条件下酶活力较低，如芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 和土壤杆菌属 (*Agrobacterium* sp.) 来源的 DPEase (最适 pH 为 7.5–8.0)^[30-31]。与之不同，重组 *Nt*DPEase 为中性酶，在 pH 6.5 仍具有 80% 以上的催化活性，可以避免碱性条件 D-果糖溶液褐变，对 D-阿洛酮糖的生产十分有利。现有 DPEase 催化最适温度普遍在 50 °C 以上，如塞内加尔类芽孢杆菌 (*Paenibacillus senegalensis*) 和一个热泉宏基因组来源的 DPEase 的最适温度分别为 55 °C 和 80 °C^[3,26]。较高的反应温度不仅可以加速反应，还可以避免杂菌的污染；但反应温度超过 70 °C 后 D-果糖溶液容易褐变，同时产生多种副产物，不利于 D-阿洛酮糖的分离纯化^[32]。重组 *Nt*DPEase 的最适温度为 60 °C，适合用于 D-阿洛酮糖的工业化生产。

DPEase 催化异构化反应时，反应产物与底物存在动态平衡，D-果糖的转化率普遍为 27%–30%^[5,33-34]。重组 *Nt*DPEase 催化 D-果糖生成 D-阿洛酮糖的转化率为 27%–29%，与大多数 DPEase 相近，略低于根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 来源的 DPEase (底物浓度为 700 g/L，转化率为 32.9%)^[7]，高于瘤胃球菌属 (*Ruminococcus* sp.) 来源的 DPEase (底物浓度为 500 g/L，转化率为 25%)^[35]，这与酶与底物结合效率、反应温度及底物浓度等多个因素相关^[26]。当以 500 g/L D-果糖为底物时，反应平衡常数 *K* (平衡后 D-阿洛酮糖与初始 D-果糖浓度之比) 为 0.29，也与其他 DPEase 相似^[36]。

本研究实现了嗜热新芽孢杆菌来源的 *Nt*DPEase 在毕赤酵母中的组成型表达，经高密度发酵产酶水平达 201.3 U/mL。该酶最适 pH 和最适温度分别为 pH 7.0 和 60 °C，能够催化高浓度 D-果糖 (500 g/L) 制备 D-阿洛酮糖，转化率最

高达 29.0%。本实验结果为 D-阿洛酮糖的酶法生产提供了科学依据。

REFERENCES

- [1] CHUNG MY, OH DK, LEE KW. Hypoglycemic health benefits of D-psicose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 863-869.
- [2] CHEN Z, GAO XD, LI ZJ. Recent advances regarding the physiological functions and biosynthesis of D-allulose[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 881037.
- [3] YANG JG, TIAN CY, ZHANG T, REN CX, ZHU YM, ZENG Y, MEN Y, SUN YX, MA YH. 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.
- [4] AYERS BJ, HOLLINSHEAD J, SAVILLE AW, NAKAGAWA S, ADACHI I, KATO A, IZUMORI K, BARTHOLOMEW B, FLEET GWJ, NASH RJ. Iteamine, the first alkaloid isolated from *Itea virginica* L. inflorescence[J]. *Phytochemistry*, 2014, 100: 126-131.
- [5] LONG NVD, LE TH, KIM JL, LEE JW, KOO YM. Separation of D-psicose and D-fructose using simulated moving bed chromatography[J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32(11): 1987-1995.
- [6] ZHANG H, ZHAO AQ, QU LB, XIONG WL, ALAM MA, MIAO JX, WANG WG, XU JL, LÜ YK. Engineering an efficient whole-cell catalyst for D-allulose production from glycerol[J]. *Biotechnology Journal*, 2023, 18(7): e2200600.
- [7] 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.
- [8] 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, 61(43): 10408.
- [9] PARK CS, KIM T, HONG SH, SHIN KC, KIM KR, OH DK. D-allulose production from D-fructose by permeabilized recombinant cells of *Corynebacterium glutamicum* cells expressing D-allulose 3-epimerase

- Flavonifractor plautii*[J]. PLoS One, 2016, 11(7): e0160044.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] WEI HB, ZHANG RX, WANG LY, LI DL, HANG FX, LIU JD. Expression of D-psicose-3-epimerase from *Clostridium bolteae* and *Dorea* sp. and whole-cell production of D-psicose in *Bacillus subtilis*[J]. Annals of Microbiology, 2020, 70(1): 9.
- [13] WANG YC, ZHAO N, MA JW, LIU J, YAN QJ, JIANG ZQ. High-level expression of a novel α -amylase from *Thermomyces dupontii* in *Pichia pastoris* and its application in maltose syrup production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127: 683-692.
- [14] ZHA J, LIU D, REN J, LIU ZJ, WU X. Advances in metabolic engineering of *Pichia pastoris* strains as powerful cell factories[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(10): 1027.
- [15] WATERHAM HR, DIGAN ME, KOUTZ PJ, LAIR SV, CREGG JM. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. Gene, 1997, 186(1): 37-44.
- [16] HUANG H, LIANG QX, WAN Y, CHEN J, KANG Z. High-level constitutive expression of leech hyaluronidase with combined strategies in recombinant *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1621-1632.
- [17] QIN XL, QIAN JC, YAO GF, ZHUANG YP, ZHANG SL, CHU J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(11): 3600-3608.
- [18] NISHA M, SATYANARAYANA T. Characteristics and applications of recombinant thermostable amylopullulanase of *Geobacillus thermoleovorans* secreted by *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(6): 2357-2369.
- [19] YANG PZ, ZHU XX, ZHENG Z, MU DD, JIANG ST, LUO SZ, WU Y, DU MR. Cell regeneration and cyclic catalysis of engineered *Kluyveromyces marxianus* of a D-psicose-3-epimerase gene from *Agrobacterium tumefaciens* for D-allulose production [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2018, 34(5): 65.
- [20] ZHAO W, ZHENG J, ZHOU HB. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(16): 7538-7547.
- [21] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [22] LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [23] JIA DX, SUN CY, JIN YT, LIU ZQ, ZHENG YG, LI MA, WANG HY, CHEN DS. 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.
- [24] MARTÍNEZ D, MENÉNDEZ C, CHACÓN O, FUENTES AD, BORGES D, SOBRINO A, RAMÍREZ R, PÉREZ ER, HERNÁNDEZ L. Removal of bacterial dextran in sugarcane juice by *Talaromyces minioluteus* dextranase expressed constitutively in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2021, 333: 10-20.
- [25] KITTL R, GONAUS C, PILLEI C, HALTRICH D, LUDWIG R. Constitutive expression of *Botrytis aclada* laccase in *Pichia pastoris*[J]. Bioengineered, 2012, 3(4): 232-235.
- [26] PATEL SN, KAUSHAL G, SINGH SP. A novel D-allulose 3-epimerase gene from the metagenome of a thermal aquatic habitat and D-allulose production by *Bacillus subtilis* whole-cell catalysis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(5): e02605-19.
- [27] CHEN JJ, CHEN D, CHEN QM, XU W, ZHANG WL, MU WM. Computer-aided targeted mutagenesis of *Thermoclostridium caenicola* D-allulose 3-epimerase for improved thermostability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(6): 1943-1951.
- [28] 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.

- [29] XIA PF, ZHANG GC, LIU JJ, KWA S, TSAI CS, KONG II, SUNG BH, SOHN JH, WANG SG, JIN YS. Groe chaperonins assisted functional expression of bacterial enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(10): 2149-2155.
- [30] PATEL SN, KAUSHAL G, SINGH SP. D-allulose 3-epimerase of *Bacillus sp.* origin manifests profuse heat-stability and noteworthy potential of D-fructose epimerization[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 60.
- [31] TSENG WC, CHEN CN, HSU CT, LEE HC, FANG HY, WANG MJ, WU YH, FANG TY. Characterization of a recombinant D-allulose 3-epimerase from *Agrobacterium sp.* ATCC 31749 and identification of an important interfacial residue[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 112: 767-774.
- [32] XU Z, LI S, FENG XH, LIANG JF, XU H. L-arabinose isomerase and its use for biotechnological production of rare sugars[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(21): 8869-8878.
- [33] LI ZJ, FENG LX, CHEN Z, HU YF, FEI KQ, XU HL, GAO XD. 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.
- [34] TANG XR, AN YF, IQBAL MW, CONG HR, ZHANG GY, ZHANG YF, RAVIKUMAR Y, ZABED HM, ZHAO M, ZHOU HX, QI XH. The characterization of a novel D-allulose 3-epimerase from *Blautia produca* and its application in D-allulose production[J]. *Foods*, 2022, 11(20): 3225.
- [35] Zhu Y, Men Y, Bai W, Li X, Zhang L, Sun Y, Ma Y. 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.
- [36] 华晓晗, 李延啸, 马俊文, 刘海杰, 闫巧娟, 江正强. 链霉菌来源 D-甘露糖异构酶的性质及其在制备 D-甘露糖中的应用 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(6): 1930-1941.
- HUA XH, LI YX, MA JW, LIU HJ, YAN QJ, JIANG ZQ. Characterization of a D-mannose isomerase from *Streptomyces sp.* and its application in the preparation of D-mannose[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(6): 1930-1941 (in Chinese).