

D-阿洛酮糖酶法生产的研究进展

李 勉¹, 唐文娟¹, 蔡 雪^{1,2}, 程新平¹, 柳志强²

(1. 浙江华康药业股份有限公司, 浙江 杭州 310013; 2. 浙江工业大学 生物工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 稀有单糖 D-阿洛酮糖是 D-果糖的 C-3 差向异构体, 主要通过 D-塔格糖 3-差向异构酶或 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶对 D-果糖进行异构化获得。D-阿洛酮糖不仅可以作为食品添加剂和膳食补充剂, 而且具有改善胰岛素抵抗、增强抗氧化和降血糖控制等多种生理功能。因此, D-阿洛酮糖作为传统高能量糖如蔗糖、果糖等的健康替代品, 具有重要的研究价值。作者综述了 D-阿洛酮糖的理化性质、来源、体内代谢、生理功能、应用和最新生产技术, 讨论了 D-阿洛酮糖生产中存在的问题及解决方案。针对低废物生成、低能耗、高糖产量等特点, 提出了一种绿色、可循环利用的 D-阿洛酮糖生产工艺技术。

关键词: D-阿洛酮糖; 替代甜味剂; 差向异构酶; 生物转化

中图分类号: Q 933 文章编号: 1673-1689(2021)07-0001-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.001

Recent Advances in Enzymatic Production of D-Allulose

LI Mian¹, TANG Wenjuan¹, CAI Xue^{1,2}, CHENG Xinping¹, LIU Zhiqiang²

(1. Zhejiang Huakang Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310013, China; 2. College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: The rare monosaccharide D-allulose is a C-3 epimer of D-fructose, which is mainly produced through the isomerization of D-fructose by D-tagatose 3-epimerases (DTEases) or D-allulose 3-epimerases (DAEases). D-Allulose can not only be used as a food ingredient and dietary supplement, but also exhibits a variety of physiological functions and health benefits such as insulin resistance improvement, antioxidant enhancement and hypoglycemic controls. Therefore, D-allulose is of great value in development and research as a healthy alternative for conventional high-energy sugars such as sucrose and fructose. This review provides a systematic analysis of physicochemical property, existing sources, metabolism *in vivo*, physiological functions, applications and recent processing technologies of D-allulose. The existing problems and proposed solutions in the production of D-allulose are discussed. A green and recyclable process technology for D-allulose production is also proposed for low waste generation, low energy consumption and high conversion.

Keywords: D-allulose, substitute sweetener, epimerase, biotransformation

收稿日期: 2020-08-07

基金项目: 浙江省引进培育领军型创新创业团队项目(2018R01014); 浙江省教育厅一般科研项目(GZ20311050005); 衢州市科技计划项目(2019K09)。

作者简介: 李 勉(1969—), 男, 博士, 教授, 主要从事生物化工的产业化技术研究及开发。E-mail: mian.li@huakangpharma.com

1 D-阿洛酮糖概述

D-阿洛酮糖(D-allulose)属于己酮糖,是D-果糖的C-3差向异构体,因其较高的甜度和较低的能量以及独特的生理功能和潜在的健康益处,D-阿洛酮糖被认为是具有较大潜力的新型甜味剂,已成为全球范围内稀有糖生物合成领域的研究热点。然而,D-阿洛酮糖在自然界中存在量极其稀少,化学法合成困难,而生物合成法步骤简单,近些年有较大的突破。因此,作者综述了D-阿洛酮糖在近年内的生物合成研究进展,包括D-阿洛酮糖的理化性质、生理功能、应用、体内代谢以及生物酶法生产涉及关键酶的来源、酶学性质、晶体结构、催化机理、异源表达、D-阿洛酮糖的分离与纯化工艺。

1.1 D-阿洛酮糖的理化性质与来源

D-阿洛酮糖是一种六碳糖,熔点为96℃,易溶于水,密度为1.35 g/cm³[1]。D-阿洛酮糖的甜味是蔗糖甜味的70%^[2]。D-阿洛酮糖是一种还原糖,能够参与热处理过程中的褐变反应。经大鼠实验测得D-阿洛酮糖的热值为0.029 kJ/g,能量为蔗糖的0.3%,这表明D-阿洛酮糖的能量近乎为零^[3-4]。

D-阿洛酮糖在自然界中非常罕见,植物来源极其稀少^[5],在某些细菌中也有发现少量阿洛酮糖^[6],动物中不存在D-阿洛酮糖。然而,D-阿洛酮糖也出现在各种食品中,如经过长期加热处理的果汁,并且D-阿洛酮糖在各类食品中的含量与生产过程中的糖浓度、温度和加热时间密切相关^[2,7]。

1.2 D-阿洛酮糖的生理功能与体内代谢

D-阿洛酮糖的生理功能包括:减少膳食D-果糖和D-葡萄糖的吸收^[8-9];增强胰岛素抵抗^[7,10-11];抗肥胖活性^[12-14];降血脂^[15]。D-阿洛酮糖在大鼠体内的代谢途径研究表明:1)D-阿洛酮糖在肠道内的转运由葡萄糖转运体5型介导,其相对于D-果糖亲和力较低^[16-18];2)D-阿洛酮糖不参与葡萄糖的相关代谢^[19];3)D-阿洛酮糖在动物肝脏中无法代谢,进而无法促进肝脏能量的产生^[20]。大约98%的D-阿洛酮糖通过口服或静脉注射后以尿液和粪便这两种形式从体内排出,只有少量D-阿洛酮糖在盲肠微生物的作用下分解为短链脂肪酸^[21]。

1.3 D-阿洛酮糖的应用

D-阿洛酮糖在2011年被美国FDA批准为“一般认为安全的”(GRAS, Generally Regarded As Safe)

产品,并被允许作为食品配料和膳食补充剂^[4,7]。研究表明,D-阿洛酮糖最大摄入量每天每千克体质量为0.55 g,在此范围内不会导致人类腹泻^[8-9]。

D-阿洛酮糖因其低热量、高甜度、还原性强等特性,在食品行业具有广阔的市场潜力。例如,D-阿洛酮糖通过美拉德反应可全面改善蛋清蛋白的性质,如优异的凝胶强度、乳化稳定性、发泡性能和抗氧化活性等^[22-23]。D-阿洛酮糖也可以改善发酵乳制品的品质,调节过度发酵导致酸奶带有的强烈酸味,但不影响发酵菌株的益生菌活性及其赋予发酵产品的益生健康功效^[21]。另外,在烘焙过程中使用25%的D-阿洛酮糖,配合使用其他添加剂,可生产无糖蛋糕^[24]。

D-阿洛酮糖在其他领域也有广泛的应用潜力。例如,以D-阿洛酮糖为原料的植物基材料可用作光学设备和液晶显示器的永久性、防水、环保、透光薄膜^[25]。D-阿洛酮糖还是第一种被发现的糖类驱虫剂,在抑制寄生虫生长方面有一些积极作用^[26-27]。D-阿洛酮糖也是其他己糖的前体,对D-阿洛糖^[28-29]、D-阿洛糖醇^[30]的生产起着极其重要的作用。

2 D-阿洛酮糖的生产

2.1 生物酶法

D-阿洛酮糖的化学合成法具有分离困难、副产物多、化学废物的产生等较难克服的共性缺点。因此,绿色与环保的生物酶法生产逐渐受到了世界范围内广泛的关注。

2.1.1 DTEase 家族酶的来源 D-塔格糖-3-差向异构酶家族(DTEases)是一种催化酮单糖C3位置使其发生异构化的酶,也是生产稀有糖的核心酶^[32]。

DTEase 家族酶包括:D-塔格糖 3-差向异构酶(D-tagatose 3-epimerase, DTEases)^[33],D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(D-allulose 3-epimerase, DAEase)^[35],酮糖 3-差向异构酶(Ketose 3-epimerase)^[36],这些酶都具有共同特性即能够催化D-果糖转化为D-阿洛酮糖。

DTEase 酶的编码基因已相继从 *Clostridium cellulolyticum* H10^[37]、*Ruminococcus* sp.^[38]、*Clostridium scindens*^[34]以及 *Desmospora* sp.^[35]中分离鉴定出来,但仍需要进一步挖掘更多来源和更高效酶活的DTEase^[32,37,39-40]用于D-阿洛酮糖的工业化生产。

2.1.2 DTEase 的酶学性质 在DTEase 家族酶中,

D-阿洛酮糖-3-差向异构酶(DTEase)在催化 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖的反应中具有最高的效率。来自 *C. cellulolyticum* 和 *A. tumefaciens* 的 DAEases 催化效率(K_{cat}/K_m)分别为 186.4、205 L/(mmol·min),

高于来自 *Clostridium* sp.的 DTEase(D-塔格糖 3-差向异构酶)的催化效率(141.4 L/(mmol·min))和来自 *Ruminococcus* sp.的催化效率(51 L/(mmol·min))^[34,37-38], 见表 1。

表 1 DTEase 家族酶的酶学特性
Table 1 Enzymatic properties of DTEases

来源	相对分子质量	最适温度/℃	最适 pH	金属离子	半衰期/min	平衡常数	(k_{cat}/K_m)/ (L/(mmol·min))	参考文献
<i>Paenibacillus senegalensis</i>	33.5	55	8.0	Mn ²⁺	—	30:70	39	[41]
<i>Caballeronia fortuita</i>	33	65	7.5	Co ²⁺	63	37.5:62.5	—	[42]
<i>Sinorhizobium</i> sp.	—	50	8.0	Mn ²⁺	—	—	—	[43]
<i>Staphylococcus aureus</i>	134.13 (tetramer)	70	8.0	Mg ²⁺	—	—	—	[44]
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC 31749	32	55~60	7.5~8.0	Co ²⁺	267(55 °C)	30:70	—	[45]
<i>Arthrobacter globiformis</i> M30	128 (tetramer)	70	7.0~8.0	Mn ²⁺	—	—	—	[46]
<i>Flavonifractor plautii</i>	33	65	7.0	Co ²⁺	130	—	156	[40]
<i>Bacillus subtilis</i>	—	55	7.5~8.0	—	170	—	—	[47]
<i>Treponema primitia</i> ZAS-1	—	70	8.0	Co ²⁺	~30	28:72(70 °C)	144	[48]
<i>Dorea</i> sp. CAG317	33	70	6.0	Co ²⁺	~30	30:70(70 °C)	412	[49-50]
<i>Clostridium bolteae</i>	139 (tetramer)	55	7.0	Co ²⁺	156	32:68(60 °C)	107	[32]
<i>Clostridium</i> sp.	130 (tetramer)	65	8.0	Co ²⁺	15	28:72	141.4	[34]
<i>Clostridium scindens</i> 35704	132 (tetramer)	60	7.5	Mn ²⁺	108	28:72 (50 °C)	64.5	[35]
<i>Ruminococcus</i> sp.	132 (tetramer)	60	7.5~8.0	Mn ²⁺	96	28:72	51	[38]
<i>Clostridium cellulolyticum</i>	132 (tetramer)	55	8.0	Co ²⁺	408	32:68	186.4	[37]
metagenome of thermal aquatic		60, 70	6~11	Co ²⁺ , Mn ²⁺		28:72		[51]

金属离子通过结合 D-果糖进行固定,在 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖过程中起着至关重要的作用。Asp183 和 His209 残基通过金属离子与底物进行有效结合。DTEase 家族酶金属离子 Mn²⁺、Co²⁺和 Mg²⁺的依赖程度明显不同^[41,44-45]。然而, *C. cellulolyticum* 中的 DAEase 和 *C. scindens* 中的 DTEase 酶活的发挥严格依赖于金属离子 Mn²⁺和 Co²⁺^[35,37]。

2.1.3 DTEase 的晶体结构 在 DTEase 家族酶中,来自 *A. tumefaciens* 和 *C. cellulolyticum* 中 DAEases 展现出最紧密的四聚体形式。在 DAEase 的四聚体中,氨基酸残基在 2 个亚基之间形成 34 个氢键, DAEase 的高催化活性归因于宽的界面溶剂可及区

域,这是由 DTEase 家族酶中两个二聚体之间的广泛相互作用引起的^[42]。此外,重组菌株表达的 DAEase 仍表现出优异的酶学性能。来自 *C. cellulolyticum* H10 中的 DAEase 异源表达具有较长的半衰期、较高的动力学参数和较高的热稳定性^[37]。

DAEase 的四聚体排列是由 A、B、C、D 共 4 个相同亚基组成的一个不对称单元。活性位点含有 4 个残基的金属离子,八面体配位 2 个水分子。这 4 个亚基是与晶体对称相关的二聚体,其中亚基 A 和 D 相互作用,两者都与亚基 B 和 C 密切接触。DAEase 的活性位点暴露在二聚体的同一前侧。这些稳定的二聚体提供了一个很好的可接近表面,以

便结合在二聚体正面上的底物^[16]。

活性位点的疏水性沟槽和可接近的表面位于 A 亚基和 B 亚基之间。DAEase 的亚基侧是封闭的,并在桶状结构的两端暴露。在 DAEase 的四聚体中,两个二聚体是封闭在桶状结构侧面。每个单体(A、B、C 和 D 亚基)是由 8 个(β/α)结构的重复单位组成。每个单体由 13 个 α -螺旋和 8 个 β -折叠组成,形成单体的主要结构^[16]。

2.1.4 DTEase 的催化机理 DTEase 家族酶的催化作用取决于各亚基的分子排列,它们的活性位点位于底物上,以实现高效的酶反应。 Mn^{2+} 和 2 个水分子及 4 个氨基酸(Glu、Asp、His 和 Glu)形成八面体配位,这 4 个氨基酸残基在所有酮糖 3-差向异构酶中完全保守。来自 *A. tumefaciens* 中的 DAEase 和 *P. cichorii* 中的 DTEase 上的 6 个残基(Glu50/Glu52、Asp183/Asp185、His209/His211、Glu244/Glu246、Glu56/Glu158、His185/His188)在位点定向诱变中对底物结合和热稳定性起着重要作用。

催化底物取代水分子后,活性位点发生差向异构化。两个残基 Glu50 和 Glu244 在 Mn^{2+} 的协作下,D-果糖 C3 上的质子被去除,生成 D-阿洛酮糖的顺式二元醇中间体,D-阿洛酮糖从 DAEase 活性位点上的氢键和水分子之间的位置释放出来。

目前,对 DTEase 家族酶进行分子修饰以提高其催化活性和热稳定性。定点诱变是为了提高来自 *Caldicellulosiruptor obsidiansis* 中的 L-鼠李糖异构酶在生产 D-阿洛酮糖方面的热稳定性和催化行为,在 β_1 - α_1 -loop 中的疏水残基被极性氨基酸全部取代,与野生型酶相比,V48N/G59N/I63N 和 V48N/G59N/I63N/F335S 突变体的相对活性分别提高了 105.6%、134.1%^[57]。定点诱变还提高了来自 *Dorea* sp. 中的 D-阿洛酮糖-3-差向异构酶(DAEase)的热稳定性^[50]。

对 DTEase 家族酶的催化机理方面的研究还处于初步阶段,酶结构与催化功能之间的关系有待进一步深入研究。此外,DTEase 的热稳定性和底物特异性仍存在一些不足。在稀有糖的生产中,应进一步利用 DTEase 家族酶的底物特异性,以实现功能性稀有糖的高效绿色生产。

2.1.5 DTEase 的异源表达 大多数 DTEase 家族酶从细菌中鉴定和分离,在天然菌株中表达的酶的数量远远不能满足应用的要求。因此,在特征研究

和酶学应用中构建表达载体并在异源生物中表达具有重要意义。

枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和酵母通常被用来构建 DAEase 表达的重组系统。与大肠杆菌不同,枯草芽孢杆菌没有外膜,其分泌的蛋白质可以直接释放到培养基中,且枯草芽孢杆菌的安全性为食品级,分泌的蛋白质中没有掺杂热源性脂多糖(内毒素)。工程菌大肠杆菌 *E. coli* 具备遗传背景清晰、载体受体系统完整、生长迅速、培养简单、重组体稳定等优点。此外,酵母表达系统具有培养条件简单、生长速度快、表达水平高、操作简单等特点,翻译后可对蛋白质进行加工和正确的修饰。酵母表达系统的不足在于克隆基因表达低、发酵时间长、蛋白质糖基化错误、抗细胞分裂等,且上清液中多糖浓度过高不利于重组蛋白质的纯化。

早期研究人员倾向于使用大肠杆菌作为宿主细菌来研究 DTEase 家族酶的表达和酶学性质^[34,37]。最近,许多研究人员将枯草杆菌和酵母菌作为宿主细菌来表达 DTEase 家族酶,用于 D-阿洛酮糖的生产^[35]。将来源于 *A. tumefaciens* 中的 DAEase 基因于 *E. coli* 和 *K. marxianus* 中重组表达后用于阿洛酮糖生产,D-阿洛酮糖的产量分别达到 230 g/L^[53]和 190 g/L^[56]。经比较,用大肠杆菌表达系统表达 *A. tumefaciens* 中的 DAEase 酶是目前为止表达量最高的,见表 2。

1) 大肠杆菌表达系统:大肠杆菌表达系统具有成本低以及表达效率高的优点。DTEase 家族酶在大肠杆菌中可进行可溶性过表达,用亲和层析分离和纯化重组的 DTEase 酶,D-阿洛酮糖的产量在 120~218 g/L,转化率为 24%~33%^[34]。利用全细胞反应法在重组大肠杆菌中表达 *Agrobacterium tumefaciens* 中的 DAEase 酶,其产量和转化效率分别为 230 g/L 和 33%^[53]。

2) 芽孢杆菌表达系统:携带 DAEase 编码基因的重组枯草芽孢杆菌能以高效率 and 低成本的方式过表达 DAEase 酶。固定于阴离子交换树脂基质上的重组 DAEase 能够促进阿洛酮糖的稳定高效生产。在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 中表达的重组 DAEase 酶活为 58.6 U/mg,高于大肠杆菌(8.95 U/mg)。此外,DAEase 的表达调节元件也影响酶的数量和活性。在枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 中,载体 pMA5-P_{xyA}-RDPE 能持续性地表达出酶活 95 U/mL 的

DAEase。该值高于在大肠杆菌 *E.coli* 中以 pBluescript-SK-DTE 为载体表达的酶活值^[54]。

3) 酵母表达系统: 外源 DAEase 基因可在重组 *S. cerevisiae*^[55] 和 *Kluyveromyces marxianus*^[56] 中高效表达。携来自 *A. tumefaciens* 的 DAEase 基因的 pRS424-TEFpr-ss-xy/A 的表达载体可以在 *S. cerevisiae* AN120 中表达出相对分子质量 33 000 的蛋白质^[55]。*T. thermophilus* 中的木糖异构酶基因和 *A. tumefaciens* 中的 DAEase 基因在酵母孢子中共表达以增强协同催化作用。将这两种重组酶进行固定

化,并以 *D*-葡萄糖为底物来生产 *D*-阿洛酮糖^[55]。重组木糖异构酶催化 *D*-葡萄糖转化生成 *D*-果糖,重组 DAEase 将 *D*-果糖转化为 *D*-阿洛酮糖。Yang 等人提供了一条有价值的途径来再生改造过的 *K. marxianus* 细胞,从而能够以循环催化方式来生产 *D*-阿洛酮糖^[56]。重组的 *K. marxianus* 在 12 h 内以底物质量浓度为 750 g/L 的 *D*-果糖生产出 190 g/L 的 *D*-阿洛酮糖,约 100 g 残留的 *D*-果糖被工程菌转化为 34 g 的乙醇。此外,还通过全细胞反应提供了以循环催化方式生产 *D*-阿洛酮糖生产的想法^[56]。

表 2 工程菌酶法生产 *D*-阿洛酮糖

Table 2 Bio-production of *D*-allulose by engineered strains

基因来源	酶相对分子质量	碱基数	表达菌株	表达系统及表达情况	酶活	产量(产率)	参考文献
<i>C. cellulolyticum</i> H10 ATCC35319	DAEase, 32 000	882 bp	<i>E. coli</i> BL21	pET-22b(C)-Cc-dpe, soluble expression	NR	218 g/L	[37]
<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	DAEase, 33 000	876 bp	<i>E. coli</i> BL21	pET-21a-dpe, soluble expression	8.95 U/mg	125 g/L	[38]
<i>Clostridium</i> sp. BNL1100	DAEase, 32 000	879 bp	<i>E. coli</i> BL21	pET-22b(C)-Clsp-dpe, soluble expression	NR	120 g/L	[34]
<i>E. coli</i> JM109	DTEase, 29 800	789 bp	<i>E. coli</i> BL21	pET-15b-DTE, soluble expression	NR	NR	[59]
<i>A. tumefaciens</i>	DAEase, 33 000	870 bp	<i>S. cerevisiae</i> AN120	pRS424-TEFpr-ss-xy/A, soluble expression	NR	12.0%	[55]
<i>A. tumefaciens</i> ATCC 33970	DAEase, 33 000	870 bp	<i>E. coli</i> ER2566	pET-24a(C)-dpe, soluble expression	NR	230 g/L	[53]
<i>Treponema primitia</i> ZAS-1	DAEase, 33 300	888 bp	<i>E. coli</i> BL21	pET-22b(C)-dpe, secretion expression	NR	137.5 g/L	[48]
<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	DAEase, 33 000	876 bp	<i>B. subtilis</i> 1A751	pMA5-P _{xyA} -RDPE, secretion expression	95 U/mL	145 g/L	[54]
<i>Ruminococcus</i> sp. 5_1_39BFAA	DAEase, 33 000	876 bp	<i>B. subtilis</i>	pNCMO2-P2-dpe, soluble expression	58.6 U/mg	NR	[60]
<i>A. tumefaciens</i>	DAEase, 33 000	870 bp	<i>K. marxianus</i>	pRS42H-dpe, soluble expression	NR	190 g/L	[56]

NR; not reported.

2.2 *D*-阿洛酮糖的分离与纯化

D-阿洛酮糖的分离纯化主要包括以下两种方法:

第一种方法是离子交换树脂。采用阴离子交换树脂基质和同步移动床层析法对 DAEase 酶进行固定化,以 *D*-果糖为底物生产 *D*-阿洛酮糖。采用离子交换树脂透析法, *R. sphaeroides* SK011 细胞能够以初始底物质量浓度为 50 g/L 的 *D*-果糖生产出 6.5 g/L 的 *D*-阿洛酮糖^[39],生产速率为 0.82 g⁻¹·h⁻¹。

对于含有 *D*-阿洛酮糖和 *D*-果糖的混合系统,首先将 *D*-果糖转化为葡萄糖酸,然后通过阴离子交换树脂得到纯度为 91.2% 的 *D*-阿洛酮糖^[57]。

第二种方法采用生物法纯化 *D*-阿洛酮糖。在含有 *D*-阿洛酮糖和 *D*-果糖混合体系中,利用酵母消耗残留的 *D*-果糖生产乙醇,进而得到 *D*-阿洛酮糖。此外,将渗透蒸发技术、阳离子交换色谱法和生物法相结合,对 *D*-阿洛酮糖进行分离纯化,其纯度可达 86.2%^[58]。

3 讨论

D-阿洛酮糖是 *D*-果糖的 C-3 差向异构体,具有诸多生理功能,在食品、医药和保健等领域有着广泛应用。2019 年 4 月美国 FDA 通过了将阿洛酮糖排除在添加糖和总糖计数外的利好措施后,各大企业开始对阿洛酮糖产生了极大的兴趣。目前,全球 *D*-阿洛酮糖的主要生产商韩国希杰第一制糖株式会社、英国泰莱和日本松谷集团都采用生物方法生产 *D*-阿洛酮糖。因此,构建可催化产 *D*-阿洛酮糖的基因工程菌是实现 *D*-阿洛酮糖产业化的重要基础。尽管目前阿洛酮糖还只能在个别国家合法使用,但无疑它将成为未来甜味剂领域中的“巨星”。

尽管 *D*-阿洛酮糖的生物酶法研究已经取得了很大突破,尤其是基因挖掘和细胞构建技术发展迅速,但是生物法制备 *D*-阿洛酮糖的工业化前景依然不容乐观。后续的研究可以从以下两方面入手:1) 通过基因挖掘的方法筛选具有较高活性和较高稳定性的 DTEase 家族酶,建立高效的高通量筛选法,对 DTEase 家族酶进行分子改造,使其更能满足工业化的需求,从而实现 *D*-果糖与 *D*-阿洛酮糖的高效转化;2) 由于工业上制备 *D*-阿洛酮糖面临着酶催化后的混合液中去除残留 *D*-果糖的问题,分离纯化 *D*-阿洛酮糖增加了其生产成本。目前有关

D-阿洛酮糖的分离纯化、结晶等技术类的研究比较少,表明下游的产业化相对滞后,需要通过简化下游的工艺步骤,如分离纯化、结晶、干燥等工艺步骤进一步降低 *D*-阿洛酮糖的工业化生产成本和提高 *D*-阿洛酮糖的生产效率。

图 1 展示了较为先进的 *D*-阿洛酮糖绿色可回收的工艺技术^[6]。整个反应体系在生物反应器 A(用于蔗糖水解和 *D*-阿洛酮糖酶法转化) 和生物反应器 B(用于乙醇生产、*D*-阿洛酮糖分离和酵母增殖) 之间进行。以未加工的甘蔗汁或甜高粱汁为原料生产蔗糖,使用的工程酵母菌含有天然的蔗糖酶和重组的外源 DTEase 家族酶基因,因此工程酵母能够通过蔗糖酶水解蔗糖生产 *D*-葡萄糖和 *D*-果糖,*D*-果糖在 55~60 °C 被 DTEase 家族酶转化为 *D*-阿洛酮糖,而剩余的 *D*-葡萄糖和 *D*-果糖在 27~30 °C 被发酵生成乙醇,乙醇收集后可作为燃料使用。该方法的优点为原料成本低,尽可能利用过程中产生的中间产品,减少了繁琐的分离纯化步骤,同时减少了废物形成,降低能耗,提高了糖产量。

4 展望

目前在中国、日本、韩国、美国和英国,*D*-阿洛酮糖已经实现了吨级工业化生产。生产 *D*-阿洛酮糖的企业要在激烈的行业竞争中脱颖而出,必须提

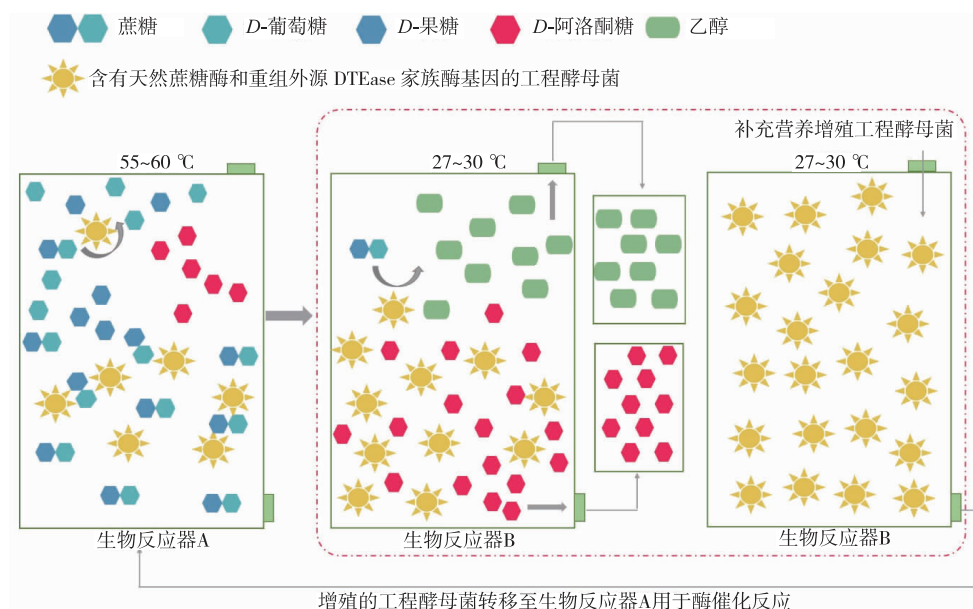


图 1 *D*-阿洛酮糖的绿色、可回收的工艺技术路线

Fig. 1 Green and recycling process for *D*-allulose conversion and ethanol production

升工艺流程中各个环节的技术。目前主要的生产壁垒在于异构酶的活性不高、转化率低和重复利用频率低。因此,提高酶活性、稳定性和催化效率应该是未来 DTEase 家族酶研究和开发的关键目标。通过脱色、脱盐、结晶、干燥等工艺的改进,降低 *D*-阿洛酮糖的生产成本。采用高效的高通量筛选技术进行

合理的设计或改变不合理的工艺是改变 DTEase 家族酶结构的直接途径。通过对 DTEase 家族酶的改良和生产工艺的改进,可以降低 *D*-阿洛酮糖的生产成本、降低其价格,从而保证 *D*-阿洛酮糖能够方便地供给广大消费者。

参考文献:

- [1] FUKADA K, ISHII T, TANAKA K, et al. Crystal structure, solubility, and mutarotation of the rare monosaccharide *D*-psicose[J]. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 2010, 84(6): 678-678.
- [2] OSHIMAH, KIMURA I, IZUMORI K. Psicose contents in various food products and its origin[J]. **Food Science and Technology Research**, 2006, 12(2): 137-143.
- [3] MATSUO T, SUZUKI H, HASHIGUCHI M, et al. *D*-psicose is a rare sugar that provides no energy to growing rats[J]. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 2002, 48(1): 77-80.
- [4] MU W, ZHANG W, FENG Y, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of *D*-psicose[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 94(6): 1461-1467.
- [5] Benjamin J Ayers, Jacqueline Hollinshead, Alexander W Saville, et al. Iteamine, the first alkaloid isolated from *Iteawirginica* L. in florescence[J]. **Phytochemistry**, 2014, 100(2): 126-131.
- [6] ZHANG L, MU W, JIANG B, et al. Characterization of *D*-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts *D*-fructose into *D*-psicose[J]. **Biotechnology Letters**, 2009, 31: 857-862.
- [7] ZHANG W, YU S, ZHANG T, et al. Recent advances in *D*-allulose: physiological functionalities, applications, and biological production[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2016, 54(54): 127-137.
- [8] HOSSAIN A, YAMAGUCHI F, HIROSE K, et al. Rare sugar *D*-psicose prevents progression and development of diabetes in T2DM model Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats[J]. **Drug Design, Development and Therapy**, 2015, 9: 525-535.
- [9] HOSSAIN A, YAMAGUCHI F, MATSUO T, et al. Rare sugar *D*-allulose: potential role and therapeutic monitoring in maintaining obesity and type 2 diabetes mellitus[J]. **Pharmacology & Therapeutics**, 2015, 155: 49-59.
- [10] HOSSAIN M A, KITAGAKI S, NAKANO D, et al. Rare sugar *D*-psicose improves insulin sensitivity and glucose tolerance in type 2 diabetes Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats[J]. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011, 405(1): 7-12.
- [11] OCHIAI M, NAKANISHI Y, YAMADA T, et al. Inhibition by dietary *D*-psicose of body fat accumulation in adult rats fed a high-sucrose diet[J]. **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, 2013, 77(5): 1123-1126.
- [12] CHUNG Y M, LEE J H, KIM D Y, et al. Dietary *D*-psicose reduced visceral fat mass in high-fat diet-induced obese rats[J]. **Journal of Food Science**, 2012, 77(2): H53-H58.
- [13] CHUNG M Y, OH D K, LEE K W. Hypoglycemic health benefits of *D*-psicose[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(4): 863-869.
- [14] IIDA T, YAMADA T, HAYASHI N, et al. Reduction of abdominal fat accumulation in rats by 8-week ingestion of a newly developed sweetener made from high fructose corn syrup[J]. **Food Chemistry**, 2013, 138(2-3): 781-785.
- [15] OCHIAI M, ONISHI K, YAMADA T, et al. *D*-psicose increases energy expenditure and decreases body fat accumulation in rats fed a high-sucrose diet[J]. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 2014, 65(2): 245-250.
- [16] JIANG S, XIAO W, ZHU X, et al. Review on *D*-allulose: *In vivo* metabolism, catalytic mechanism, engineering strain construction, bio-production technology[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, 8: 26.
- [17] RAN G, TAN D, ZHAO J, et al. Functionalized polyhydroxyalkanoate nano-beads as a stable biocatalyst for cost-effective production of the rare sugar *D*-allulose[J]. **Bioresource Technology**, 2019, 289: 9-18.
- [18] KISHIDA K, MARTINEZ G, IIDA T, et al. *D*-allulose is a substrate of glucose transporter type 5 (GLUT5) in the small intestine [J]. **Food Chemistry**, 2019, 277: 604-608.
- [19] IWASAKI Y, SENDO M, DEZAKI K, et al. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and

- chronotherapeutic effects of *D*-allulose[J]. **Nature Communications**, 2018, 9: 17-25.
- [20] MAENG H J, YOON J H, CHUN K M, et al. Metabolic stability of *D*-allulose in biorelevant media and hepatocytes; comparison with fructose and erythritol[J]. **Foods**, 2019, 8: 13-18.
- [21] KIMOTO-NIRA H, MORIYA N, HAYAKAWA S, et al. Effects of rare sugar *D*-allulose on acid production and probiotic activities of dairy lactic acid bacteria[J]. **Journal of Dairy Science**, 2017, 100(7): 5936-5944.
- [22] O'CHAROEN S, HAYAKAWA S, OGAWA M. Food properties of egg white protein modified by rare ketohexoses through maillard reaction[J]. **International Journal of Food Science & Technology**, 2015, 50(1): 194-202.
- [23] YAN Z, ZHANG H, GUAN Y, et al. Comparative study on the effects of *D*-psicose and d-fructose in the maillard reaction with β -lactoglobulin[J]. **Food Science and Biotechnology**, 2013, 22(2): 341-346.
- [24] LEE P, OH H, KIM S Y, et al. Effects of *D*-allulose as a sucrose substitute on the physicochemical, textural, and sensorial properties of pound cakes[J]. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2020, 44(6): e14472.
- [25] TAKEI S, HANABATA M. Eco-friendly, water-repellent, light-transparent film derived from psicose using nanoimprint lithography[J]. **Materials Letters**, 2015, 143: 197-200.
- [26] HARADA M, KONDO E, HAYASHI H, et al. *D*-allose and *D*-psicose reinforce the action of metronidazole on trichomonad[J]. **Parasitology Research**, 2012, 110(4): 1565-1567.
- [27] SATO M, KUROSE H, YAMASAKI T, et al. Potential anthelmintic; *D*-psicose inhibits motility, growth and reproductive maturity of L1 larvae of *Caenorhabditis elegans*[J]. **Journal of Natural Medicines**, 2008, 62(2): 244-246.
- [28] FENG Z, MU W, JIANG B. Characterization of ribose-5-phosphate isomerase converting *D*-psicose to d-allose from *Thermotoga lettingae* TMO[J]. **Biotechnology Letters**, 2013, 35: 719-724.
- [29] YEOM S J, SEO E S, KIM Y S, et al. Increased *D*-allose production by the R132E mutant of ribose-5-phosphate isomerase from *Clostridium thermocellum*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2011, 89(6): 1859-1866.
- [30] HAN W, ZHU Y, MEN Y, et al. Production of allitol from *D*-psicose by a novel isolated strain of *Klebsiella oxytoca* G4A4[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2014, 54(10): 1073-1079.
- [31] SOENGAS R, IZUMORI K, SIMONE MI, et al. Kiliani reactions on ketoses; branched carbohydrate building blocks from d-tagatose and *D*-psicose[J]. **Tetrahedron Letters**, 2005, 46(34): 5755-5759.
- [32] JIA M, MU W, CHU F, et al. A *D*-psicose 3-epimerase with neutral pH optimum from *Clostridium bolteae* for *D*-psicose production; cloning, expression, purification and characterization[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014, 98(2): 717-725.
- [33] ZHANG L, MU W, JIANG B, et al. Characterization of *D*-tagatose-3-epimerase from *Rhodobacter sphaeroides* that converts *D*-fructose into *D*-psicose[J]. **Biotechnology Letters**, 2009, 31(6): 857-862.
- [34] MU W, ZHANG W, FANG D, et al. Characterization of a *D*-psicose-producing enzyme, *D*-psicose 3-epimerase, from *Clostridium* sp.[J]. **Biotechnology Letters**, 2013, 35(9): 1481-1486.
- [35] ZHANG W, FANG D, XING Q, et al. Characterization of a novel metal-dependent *D*-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704[J]. **Plos One**, 2013, 8, e62987.
- [36] YOSHIDA H, YOSHIHARA A, SUZUKI T, et al. Xray structure of a novel ketose 3-epimerase from *Shinella zoogloeods* which is capable of *D*-allulose production[J]. **FEBS Open Biol**, 2019, 9: 257-265.
- [37] MU W, CHU F, XING Q, et al. 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.
- [38] 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.
- [39] ZHANG L, JIANG B, MU W, et al. Bioproduction of *D*-psicose using permeabilized cells of newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* SK011[J]. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, 2009, 3(4): 393-398.
- [40] PARK C, KIM T, HONG S, et al. *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.
- [41] YANG J, TIAN C, ZHANG T, et al. 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.
- [42] LI S, CHEN Z, ZHANG W, et al. 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.
- [43] ZHU Z, LI C, LIU X, et al. Biochemical characterization and biocatalytic application of a novel *D*-tagatose 3-epimerase from *Sinorhizobium* sp.[J]. **RSC Advances**, 2019, 9(6): 2919-2927.
- [44] ZHU Z, GAO D, LI C, et al. 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): 1-10.
- [45] TSENG W, CHEN C, HSU C, et al. 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.
- [46] 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.
- [47] HE W, JIANG B, MU W, et al. Production of *D*-allulose with *D*-psicose 3-epimerase expressed and displayed on the surface of *Bacillus subtilis* spores[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016, 64(38): 7201-7207.
- [48] ZHANG W, ZHANG T, JIANG B, et al. Biochemical characterization of a *D*-psicose 3-epimerase from *Treponema primitia* ZAS-1 and its application on enzymatic production of *D*-psicose[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2016, 96(1): 49-56.
- [49] 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.
- [50] ZHANG W, ZHANG Y, HUANG J, et al. Thermostability improvement of the *D*-Allulose 3-epimerase from *Dorea* sp. CAG317 by site-directed mutagenesis at the interface regions[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2018, 66: 5593-5601.
- [51] PATEL S N, KAUSHAL G, SINGH S. Characterization of 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**, 2019, 1: 1-8.
- [52] CHEN Z, CHEN J, ZHANG W, 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): 12017-12024.
- [53] 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.
- [54] CHEN J, ZHU Y, FU G, et al. High-level intra- and extra-cellular production of *D*-psicose 3-epimerase *via* a modified xylose-inducible expression system in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2016, 43(11): 1577-1591.
- [55] LI Z, LI Y, DUAN S, et al. Bioconversion of *D*-glucose to *D*-psicose with immobilized *D*-xylose isomerase and *D*-psicose 3-epimerase on *Saccharomyces cerevisiae* spores[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2015, 42(8): 1117-1128.
- [56] YANG P, ZHU X, ZHENG Z, et al. 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): 7-13.
- [57] LI C, ZHANG C, LIN J, et al. Enzymatic fructose removal from *D*-psicose bioproduction model solution and the system modeling and simulation[J]. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2018, 93(5): 1249-1260.
- [58] SONG Y, NGUYEN QA, WI SG, et al. Strategy for dual production of bioethanol and *D*-psicose as value-added products from cruciferous vegetable residue[J]. **Bioresource Technology**, 2017, 223: 34-39.
- [59] HE X, ZHOU X, YANG Z, et al. Cloning, expression and purification of *D*-tagatose 3-epimerase gene from *Escherichia coli* JM109[J]. **Protein Expression & Purification**, 2015, 114: 77-81.
- [60] LI C, LIN J, GUO Q, et al. *D*-psicose 3-epimerase secretory overexpression, immobilization, and *D*-psicose biotransformation, separation and crystallization[J]. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2018, 93(2): 350-357.