宗恩祥, 赖鲸慧, 代梦琦, 等. 普沙根瘤菌 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成途径关键酶 β-D-呋喃果糖苷酶的高通量生物信息学分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 215−225. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120325

ZONG Enxiang, LAI Jinghui, DAI Mengqi, et al. High-throughput Bioinformatics Analysis of β-D-Fructofuranosidase within β-1,3-/α-1,3-Glucan Synthetic Pathway of *Rhizobium pusense*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 215−225. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120325

· 生物工程 ·

普沙根瘤菌 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成途径关键酶 β-D-呋喃果糖苷酶的高通量生物信息学分析

宗恩祥[1], 赖鲸慧[1], 代梦琦[1], 赵 蕾[1], 赵 衍[1], 牛思远[1], 徐友强[1,2,3,*]

(1.北京工商大学食品与健康学院, 北京 100048;
2.北京工商大学老年营养与健康教育部重点实验室, 北京 100048;
3.北京工商大学中国轻工业酿酒分子工程重点实验室, 北京 100048)

摘 要: 本研究基于基因组注释信息, 探讨普沙根瘤菌的 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成途径, 重点关注该合成途径中第一步关键酶 β-D-呋喃果糖苷酶作用机制和潜在催化效率, 通过靶向挖掘其他微生物源 β-D-呋喃果糖苷酶数据进行高通量生物信息学统计对比分析。结果表明普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶的序列和结构具有高度的相似性和保守性, 其活性区域关键位点 Tyr196 和 Asp257 对催化底物起到重要作用。经数据库高通量靶向挖掘, 发现含有潜在表达 β-D-呋喃果糖苷酶的微生物中细菌源 6007 株、真菌源 746 株。其中, 代表性细菌菌株 *Francisella tularensis* OHARA 和真菌菌株 *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 的 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化效率相对较高, 分别为 10.73 和 27.40 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$。进一步分析表明, 不同来源的 β-D-呋喃果糖苷酶活性腔体空间大小、瓶颈半径的差别是导致其催化效率存在差异的原因之一。本研究为深入理解普沙根瘤菌 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的合成机制提供了重要依据, 也为开发利用其他微生物资源高效发酵生产 β-1,3/α-1,3-葡聚糖奠定了基础, 对推动相关领域的发展具有重要意义。

关键词: 普沙根瘤菌, β-1,3/α-1,3-葡聚糖, 合成途径, β-D-呋喃果糖苷酶, 高通量靶向挖掘

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002−0306(2026)01−0215−11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120325 本文网刊:

High-throughput Bioinformatics Analysis of β-D-Fructofuranosidase within β-1,3-/α-1,3-Glucan Synthetic Pathway of *Rhizobium pusense*

ZONG Enxiang[1], LAI Jinghui[1], DAI Mengqi[1], ZHAO Lei[1], ZHAO Kan[1], NIU Siyuan[1], XU Youqiang[1,2,3,*]

(1.College of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
2.Ministry of Education, Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;
3.Key Laboratory of Brewing Molecular Engineering of China Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Based on genomic annotation information, this study aimed to explore the β-1,3-/α-1,3-glucan synthetic pathway of *Rhizobium pusense*. It focused on the action mechanism and potential catalytic efficiency of β-D-fructofuranosidase, the key enzyme in the first step of this synthetic pathway. High-throughput bioinformatic statistical and comparative analysis was conducted by targeting and mining data of β-D-fructofuranosidase from other microbial sources. The results indicated

收稿日期: 2024−12−26

基金项目: "十四五"国家重点研发计划(2022YFD2101401);国家自然科学基金(32072165);黔科合支撑 [2022] 一般 021。

作者简介: 宗恩祥(1996−),男,博士研究生,研究方向:酿造微生物,E-mail:zongenxiang@st.btbu.edu.cn。

*** 通信作者:** 徐友强(1986−),男,博士,教授,研究方向:传统发酵食品重要风味与功能因子生成机制,E-mail:xuyouqiang@btbu.edu.cn。

that the sequence and structure of β-D-fructofuranosidase from *Rhizobium pusense* showed a high degree of similarity and conservation. It was clarified that the key sites Tyr196 and Asp257 in its active site played a crucial role in catalyzing the substrate. Through high - throughput targeted mining of the database, it was found that among the microorganisms with potential β-D-fructofuranosidase expression, there were 6007 bacterial sources and 746 fungal sources. Among them, the β-D-fructofuranosidase of the representative bacterial strain *Francisella tularensis* OHARA and the fungal strain *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 had relatively high potential catalytic efficiencies, which were 10.73 and 27.40 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ respectively. Further analysis suggested that differences in the size of the active cavity space and the bottleneck radius of β-D-fructofuranosidase from different sources were one of the reasons for the differences in their catalytic efficiencies. This study provides an important basis for a profound understanding of the synthesis mechanism of β-1,3-/α-1,3-glucan in *Rhizobium pusense*. It also lays the foundation for the development and utilization of other microbial resources for the efficient fermentation production of β-1,3-/α-1,3-glucan, and is of great significance for promoting the development of related fields.

Key words: *Rhizobium pusense*; β-1,3/α-1,3-glucan; synthetic pathway; β-D-fructofuranosidase; high throughput targeted mining

根据《关于 β-1,3/α-1,3-葡聚糖等 6 种“三新食品”的公告》规定，β-1,3/α-1,3-葡聚糖被增列为一种新食品原料，为其在食品领域的应用提供了法规依据。其生产工艺为：以蔗糖为主要原料，经普沙根瘤菌（*Rhizobium pusense*，又称 *Agrobacterium pusense*）发酵后，依次进行乙醇沉淀、过滤、离心分离、干燥及粉碎等工序制备而成[1]。β-1,3/α-1,3-葡聚糖（β-1,3-/α-1,3-glucan）是由 7 个 β-1,3-D-葡萄糖和 2 个 α-1,3-葡萄糖经 β-(1→3)糖苷键和 α-(1→3)糖苷键连接而成的 9 个重复单元构成主体骨架结构，无毒且具有水溶性的天然胞外葡聚糖[1−3]。由于 β-1,3/α-1,3-葡聚糖独特的分子化学结构，主体成分仍然是以 β-(1→3)糖苷键链接为核心的线性结构，故在一些研究中仍然称其为 β-葡聚糖或 β-1,3-葡聚糖[3−4]。但一些天然 β-1,3-葡聚糖同时会含有不同程度（1→4）、(1→6)葡萄糖基残基作为支链，整合连接到主体链结构中[5]。

由于 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的高分子化学结构和分子量间具有差异性，使其具有不同的特殊空间构象和理化特性。线性的高分子 β-1,3/α-1,3-葡聚糖在水中的溶解性较强，链中存在大量活泼羟基和疏水碳环，使得葡聚糖在水溶液中形成复杂得多构象共存特性[6]。基于其优良的流变学特性和食品安全性，β-1,3/α-1,3-葡聚糖在食品工业中展现出多重应用价值。该物质可作为功能性膳食补充剂，通过改善肠道菌群平衡促进胃肠道健康，其与益生菌鼠李糖乳杆菌复配使用时，可协同增强肠道蠕动功能并改善排便状况[1,7]。在高脂饮食干预研究中，β-1,3/α-1,3-葡聚糖能有效调节脂质代谢，降低肥胖相关指标水平[8]。在食品加工领域，其独特的流变特性使其可作为天然稳定剂和增稠剂，应用于低脂食品质构改良。同时，该多糖构建的水凝胶体系在食品包装材料开发中具有潜力，例如作为活性成分控释载体或智能保鲜膜基质[9−11]。在营养健康领域，该物质通过调节能量代谢和氧化应激通路，可改善运动耐力表现[12]。值得关注的是，虽然 β-1,3/α-1,3-葡聚糖在医药领域展现出抗炎、缓解肠粘膜炎等生物活性[13−15]，但其作为新食品原料的应用仍需严格遵循食品安全规范，相关药理研究为功能食品开发提供了理论支撑。

目前针对普沙根瘤菌合成 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的研究多集中于发酵条件优化及产物功能验证[1,4]，然而其生物合成机制尚未完全解析，特别是从蔗糖底物到目标多糖的代谢途径仍存在关键酶学瓶颈。这制约了菌种代谢工程改造及工业化生产效率的提升。在合成途径中，β-D-呋喃果糖苷酶（β-fructofuranosidase，EC.3.2.1.26）作为关键限速酶，通过催化蔗糖水解为 D-葡萄糖和果糖，直接决定了前体底物供应效率[16]。当前研究揭示，该酶存在 GH32、GH68、GH100 三个进化家族，其中与食品工业密切相关的 GH32 家族酶具有双结构域特征，其特异性底物结合口袋可精准识别果糖基团，展现出优于其他家族的催化稳定性[17−20]。特别值得注意的是，微生物源（如霉菌、酵母）β-D-呋喃果糖苷酶因耐高温、易规模化生产等特性，已广泛应用于食品级酶制剂开发[21]。但普沙根瘤菌来源的同功能酶却尚未获得系统性研究，这为本研究提供了独特的创新切入点。

由于新资源食品法规的限定，本文初步探究普沙根瘤菌来源 β-D-呋喃果糖苷水解酶的序列、结构和催化特性，将有助于促进菌种代谢特性的改造，提升 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成前体 D-葡萄糖的合成效率，为新资源食品 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的高效合成提供基础数据依据。本文进一步揭示了该酶的其他微生物来源分布、结构特征及潜在催化效率，剖析了不同微生物来源 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化活性差异的酶结构原因，有助于科学认知其合成过程，并为拓展其他微生物来源酶提升新资源食品 β-1,3/α-1,3-葡聚糖生产效率提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 基因组数据信息来源

基于《新食品原料安全性审查规程》对生产菌株的基因组完整性要求，通过 NCBI Genome 数据库

（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/）检索普沙根瘤菌（*Rhizobium pusense*）全基因组数据。筛选标准包括：测序深度≥50×；组装水平至染色体级别；注释基因数大于 4000 个。最终选取推荐基因组 GCA_013285525.1（N50=3.45 Mb，Contigs=3）作为模式基因组。利用 KEGG Mapper 工具进行 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成途径的模块化重建。

针对跨物种比较分析，在 NCBI Genome 数据库中检索已注释 β-D-呋喃果糖苷酶（EC 3.2.1.26）的微生物基因组数据进行高通量生物信息学统计分析，其结果经 Excel 可视化呈现。

1.2　酶序列信息来源，序列比对和系统发育分析

在 NCBI 数据库内已注释数据基础上，靶向挖掘普沙根瘤菌源具有潜在表达 β-D-呋喃果糖苷酶的氨基酸序列。多序列比对采用 ClustalW 算法（Mega 11 版），参数设置为：Gap Opening Penalty=10，Gap Extension Penalty=0.2，BLOSUM 权重矩阵。通过 Prottest-3.4.7 确定最优进化模型，采用邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树，Bootstrap 重复 1000 次评估节点置信度。使用 GeneDoc（V. 2007）进行多序列比对结果可视化。

1.3　酶的结构预测和分子对接

为深入探究该酶与配体蔗糖分子的可能作用方式，使用 SWISS-MODEL（https://swissmodel.expasy.org/）进行酶结构的三维建模和建模质量评定。分子对接参数：受体蛋白预处理，AutoDockTools 1.5.7 去除水分子、加极性氢、计算 Gasteiger 电荷；配体准备，蔗糖分子（CID=5988）从 PubChem 下载，经 Avogadro 1.2.0 进行能量最小化；设定对接盒子；采用 Lamarckian 遗传算法进行 50 次独立对接，选取结合能≤−7.0 kcal·mol^{-1} 的构象簇进行分析。后续三维和二维结构对接结果分别使用 PyMoL 和 Discovery Studio 2019 软件进行可视化呈现。酶催化底物潜在机制流程使用 Chem Draw 20.0 软件呈现。

1.4　酶催化动力学参数预测

基于深度学习的酶动力学预测[22]：在 DEEP MOLECULES 平台输入靶酶序列；底物特征编码，蔗糖采用 KEGG DRUG ID D00025，产物 D-葡萄糖使用 Isomeric SMILES 表达式：C（[C@@H]1[C@H]([C@@H]([C@H](C(O1)O)O)O)O)O；3）启用 3D-QSAR 模式，设置迭代次数 500 次，学习率 0.001；输出参数包括 k_{cat}、K_m 及催化效率（k_{cat}/K_m）。通过交叉验证评估模型可靠性（R^2>0.85）。

1.5　酶催化腔体结构分析

结构叠合与通道分析：选用上述催化效率分别在普沙根瘤菌、细菌和真菌源相对较高的酶在 PyMOL 2.5.2 中进行全原子叠合；CAVER 3.0 探测球半径、最小通道半径和路径聚类阈值；量化输出通道曲率（Curvature）、瓶颈半径（Bottleneck Radius）等拓扑参数；通过 Matplotlib 3.7.1 生成通道参数分布箱线图，三维通路模型经 Blender 3.4 渲染输出。

2　结果与分析

2.1　β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成途径和关键酶分析

目前研究和 NCBI 数据库中共有普沙根瘤菌全基因组注释的 66 株菌株全基因组数据，以经过严格质量控制和标准化处理的推荐基因组（GenBank：GCA_013285525.1）为例，该基因组注释基因 4953 个，结合基因编码酶的催化功能（https://www.enzyme-database.org/）分析，表明 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的代谢合成途径可能包括 5 步酶催化反应（图 1）。首先 β-D-呋喃果糖苷酶催化蔗糖产生 D-葡萄糖，该酶在蛋白同源性预测中未被直接标明，但结合酶的催化功能查找该酶被注释为“glycoside hydrolase family 32 protein”（protein id：QKJ90362.1）；然后经 6-磷酸葡萄糖磷酸酶（protein id：QKJ92221.1）催化葡萄糖产生 6-磷酸葡萄糖；经磷酸葡糖变构酶（protein id：QKJ93582.1）催化 6-磷酸葡萄糖产生 1-磷酸葡萄糖；又经尿苷二磷酸-葡萄糖焦磷酸化酶（protein id：QKJ93184.1）催化产生尿苷二磷酸-葡萄糖（UDP-葡萄糖）[23]；然后经葡聚糖合成酶催化 UDP-葡萄糖产生 β-1,3/α-1,3-葡聚糖。最后，由 UDP-葡萄糖聚合成 β-1,3/α-1,3-葡聚糖，该步催化的酶在普沙根瘤菌中的注释仍然不明确，结合酶功能分析得到参与催化作用的酶可能为 β-1,3 葡聚糖合成酶与 α-1,3 葡聚糖合成酶，两种酶在参考基因组中均未被明确注释，仍需要后续研究进一步分析。

在生物体内，D-葡萄糖是能够直接被利用的葡萄糖类型，这是因为生物体内的酶系在长期进化过程中适应性代谢降解 D-葡萄糖，L-葡萄糖不能被微生物直接经糖酵解代谢利用。因此，蔗糖水解产生的 D-葡萄糖能够成为 β-1,3/α-1,3-葡聚糖合成的直接底物，其生成速率与产物的合成效率密切相关，因而催化蔗糖产生 D-葡萄糖的代谢步骤对于 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的合成尤为关键（图 1）。研究证实，β-D-呋喃果糖苷酶具有催化蔗糖分解的功能，相关酶依据序列、结构特征和催化产物的不同，可以催化蔗糖产生 D-葡萄糖和 3 种不同构型的低聚果糖（菊粉型、果聚糖型、新型果寡糖）[24]。

2.2　普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶序列、结构和催化分子机制

在 NCBI 数据库已收录的 66 株普沙根瘤菌源基因组测序和注释数据中选取目前明确注释具有 β-D-呋喃果糖苷酶（EC 3.2.1.26）编码基因的 6 株普沙根瘤菌进行序列对比分析（图 2）。结果表明，普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶序列主要由 572 个核心氨基酸残基构成，6 条氨基酸序列具有高度相似性和保守性，除了 *Rhizobium pusense* SORGH_AS_1083（序列号：MDR6188921）的氨基酸序列在第 1→40 位点比其他 5 个序列长度更长外，其余序列中仅有 3 处位点存在差异（图 2：氨基酸残基底色标绿色和灰色处）。

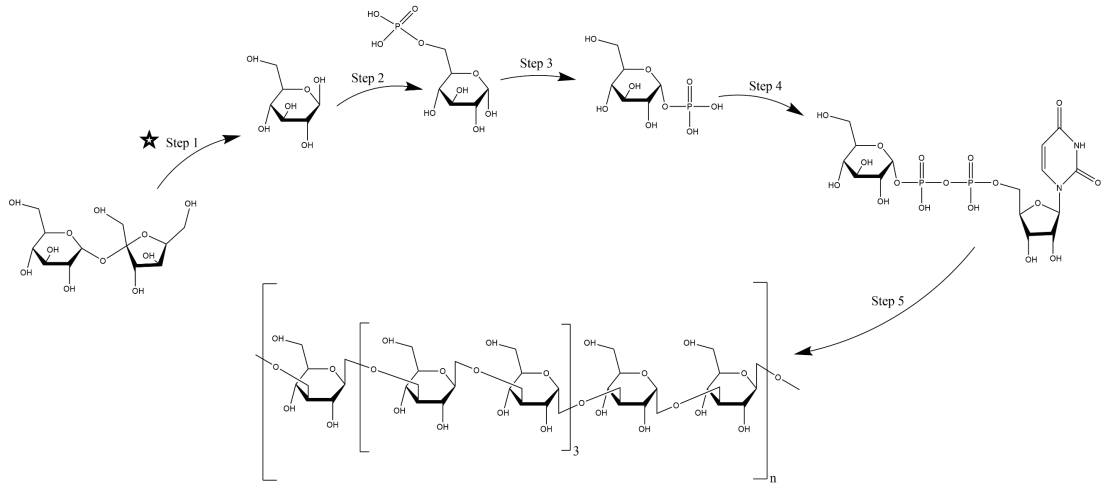


图 1 普沙根瘤菌转化蔗糖代谢合成 β-1,3/α-1,3-葡聚糖途径分析

Fig.1 Analysis of the pathway for synthesis of β-1,3/α-1,3-glucan from sucrose metabolism of *Rhizobium pusense*

注: 每步反应潜在催化酶分别为: Step1, β-D-呋喃果糖苷酶 EC 3.2.1.26, protein id: QKJ90362.1; Step2, 6-磷酸葡萄糖磷酸酶 EC 2.7.1.2, protein id: QKJ92221.1; Step3, 磷酸葡糖变构酶 EC 5.4.2.2, protein id: QKJ93582.1; Step4, UDP-葡萄糖焦磷酸化酶 EC 2.7.7.9, protein id: QKJ93184.1; Step5, α-1,3-葡聚糖合成酶 EC 2.4.1.183, protein id: 无注释, β-1,3-葡聚糖合成酶 EC 2.4.1.34, protein id: 无注释

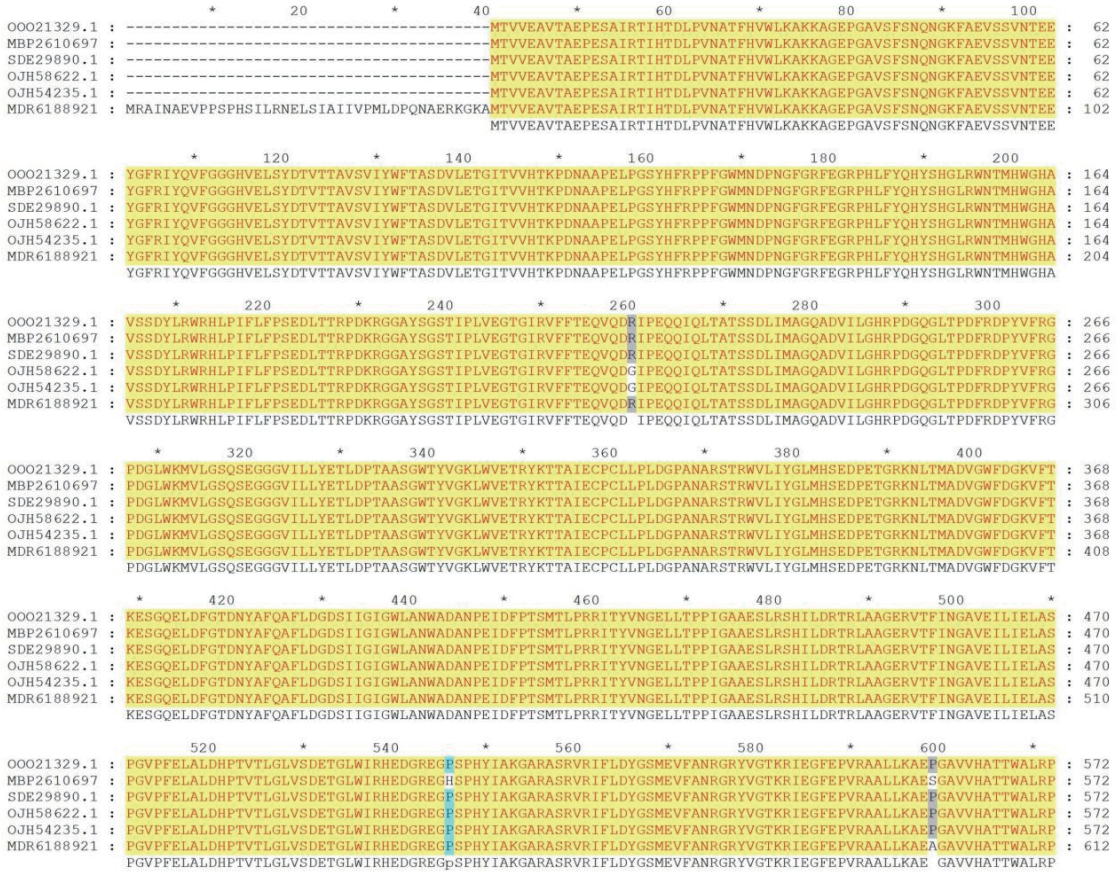


图 2 普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶序列对比分析

Fig.2 Comparative analysis of β-D-fructofuranosidase sequences from *Rhizobium pusense*

依据上述序列对普沙根酶菌源所获得的核心保守序列(Mode1: 1→572)进行酶结构模拟和催化的分子机制解析(图 3)。对氨基酸序列三维建模所得结构的质量评估值达到 0.95, 96.49% 的氨基酸残基的二面角都处于拉氏图优势区(Ramachandran Favoured), 表明预测的 β-D-呋喃果糖苷酶结构质量较高(图 3a, 3b)。对该酶二级拓扑结构分析表明该酶共有 41 个 β-折叠, 1 个 α-螺旋, 多个无规卷曲和无序缠绕结构(图 3c)。研究选用 MDR6188921 的核心保守序列(572 个氨基酸残基)同蛋白质结构数据库中已报道的 9 种具有 β-D-呋喃果糖苷水解功能的酶序列进一步对比分析(图 4), 结果表明图 4 红框

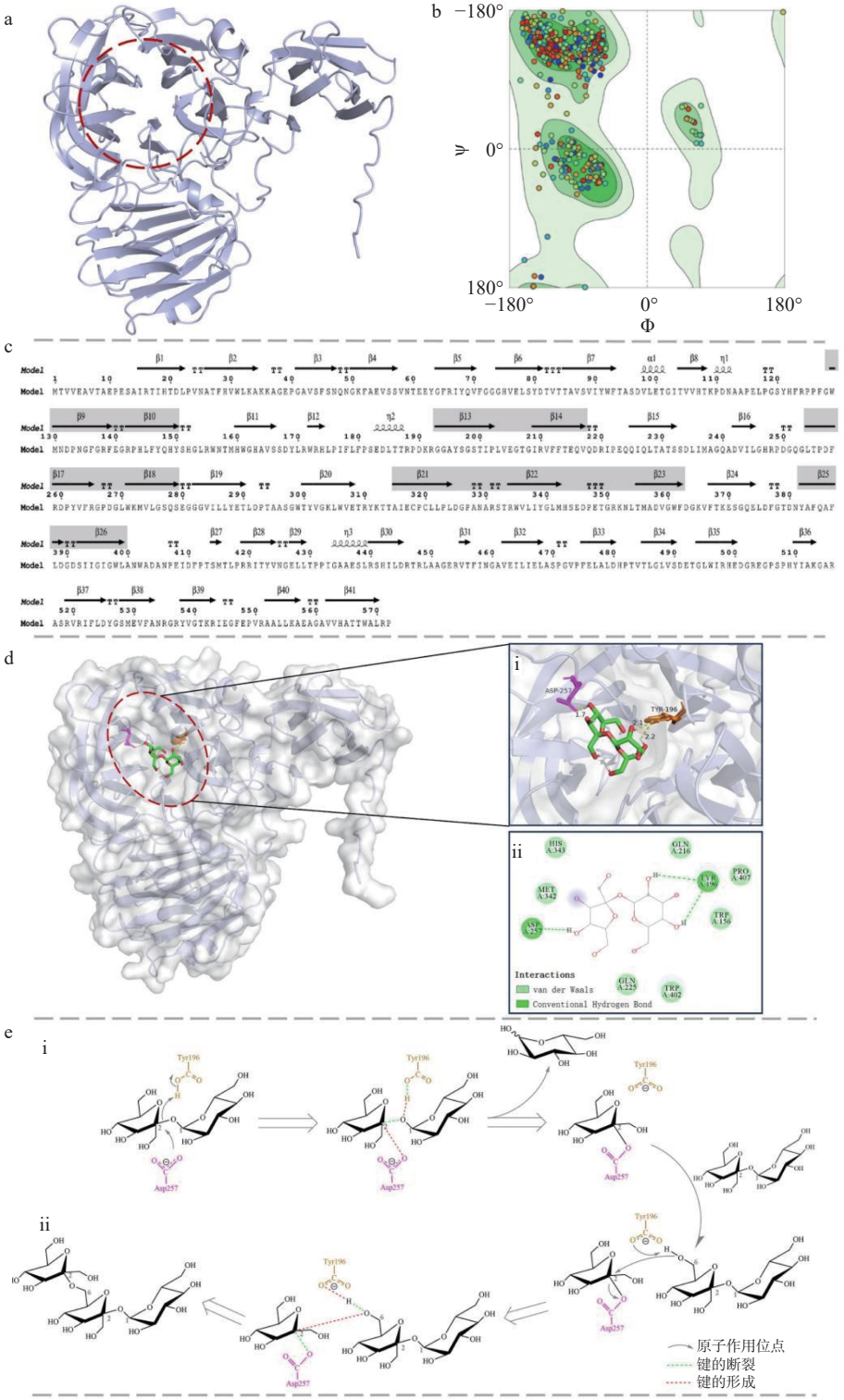


图 3　普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶的结构与催化机制分析

Fig.3　Analysis of the structure and catalytic mechanism of β-D-fructofuranosidase from *Rhizobium pusense*

注：(a)β-D-呋喃果糖苷核心保守序列三维结构同源建模；(b)建模质量评估；(c)核心保守序列二级拓扑结构；(d)酶活性区域与底物对接分析，i 和 ii 分别为三维和二维对接结果；(e)酶催化底物分子机制分析。

区域内为高保守氨基酸残基，*处为核心保守位点。其中图 4 红框区域同图 3a 三维结构中红色圈内区域和图 3c 二维拓扑结构灰色背景标记处的 N 端 β 螺旋区域即为 β-D-呋喃果糖苷酶的催化活性区域。β-D-呋喃果糖苷酶的 N 端 β 螺旋活性中心被定义为“5 叶”β 螺旋活性中心[25]。同时，研究表明该“5 叶”β 螺旋活性口袋较浅，可以催化蔗糖分子的分解[26]。

实验对蔗糖底物分子与酶的“5 叶”β 螺旋活性中心进行分子对接分析(图 3d)，结果表明，活性中心存在 2 个氨基酸残基与蔗糖分子形成 3 个氢键，将底物分子稳定于活性中心，包括底物蔗糖的 α-D-吡

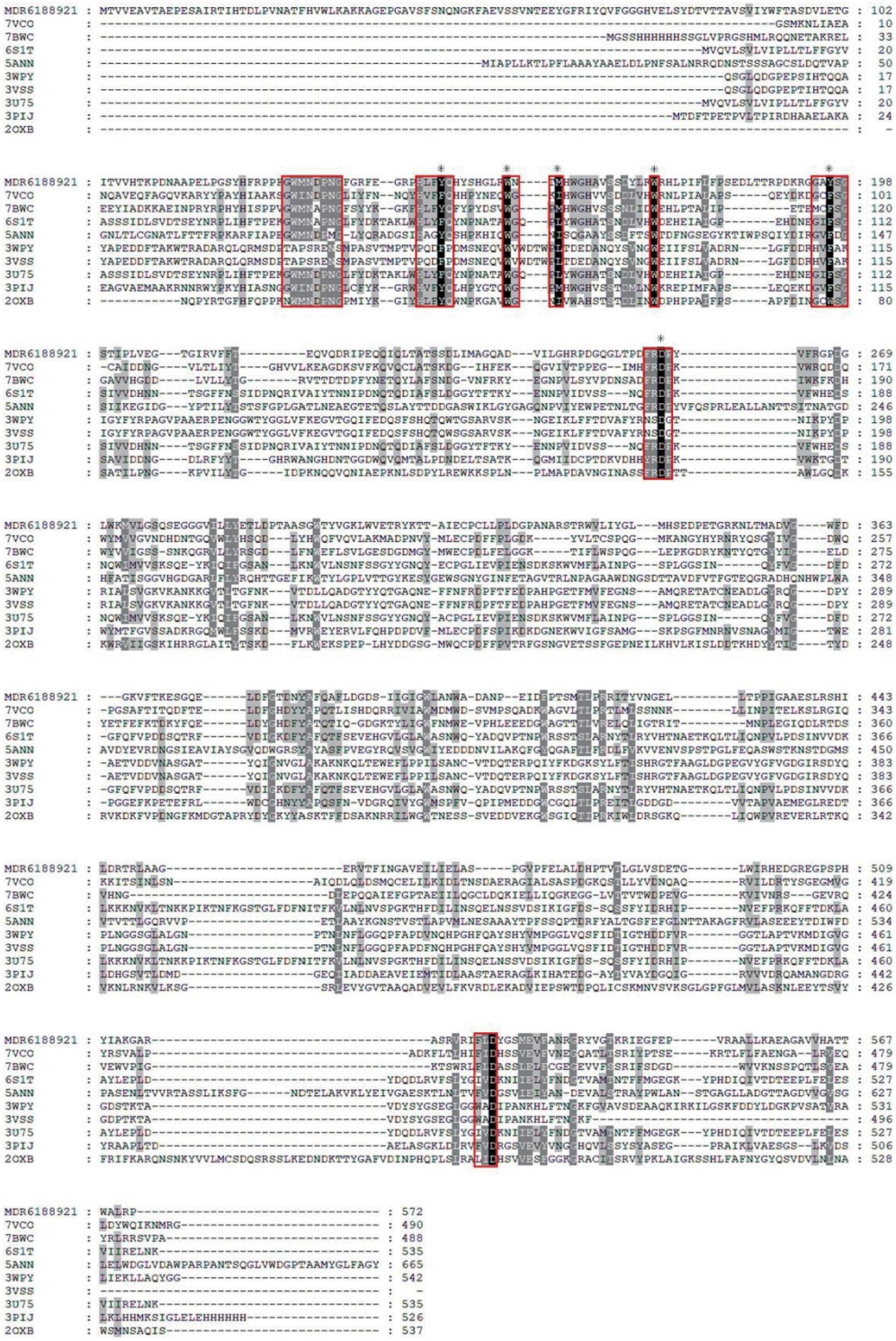


图 4 序列比对分析 β-D-呋喃果糖苷酶活性中心

Fig.4 Sequence alignment analysis of β-D-fructofuranoside active centers

注: 选用 MDR6188921 序列中的 572 个核心保守区段同蛋白质结构数据库中的 PDB 编号分别为 7VCO、7BWC、6S1T、5ANN、3WPY、3VSS、3U75、3PIJ、2OXB 的 9 个 β-D-呋喃果糖苷酶序列对比分析; 红框表示氨基酸残基高保守序列区域; *表示对比分析该酶序列位于“5 叶”β 螺旋区域处高度保守位点。

喃葡萄糖(α-Glcp)残基与酶的活性中心 Tyr196 形成两个氢键, 键长分别为 2.1 Å和 2.2 Å, 蔗糖上的 β-D-呋喃果糖残基(β-Fruf)与酶的活性中心 Asp257 形成 1 个氢键, 其键长为 1.7 Å(图 3d i)。分子对接结果还表明, 除上述形成的 3 个氢键外, 酶与底物还形成 7 个范德华力相互作用(图 3d ii)。上述结果表明 β-D-呋喃果糖苷酶的活性中心区域和蔗糖底物分子能够有很好的相互作用, 该活性中心对底物具有潜在催化能力。

根据相关研究, 总结 β-D-呋喃果糖苷水解酶的“5 叶”β 螺旋活性中心催化水解底物蔗糖的分子机制[24,27−30](图 3e)。酶的催化活性关键位点为

Tyr196 和 Asp257，Tyr196 为催化质子供体，将糖基氧原子质子化，活性中心的氨基酸残基 Asp257 对呋喃果糖残基的 C-2 碳原子进行亲核攻击，断裂底物 β-Fruf-(2↔1)-α-Glcp 之间的(2↔1)糖苷键，同时酶与 β-Fruf 形成共价中间体，置换出底物的糖基 α-Glcp 残基部分，从而产出 α-D-吡喃葡萄糖(图 3e i)。当又一分子蔗糖进入活性腔体(图 3e ii)，蔗糖的 β-Fruf 残基的 C6-OH 被攻击，Asp257 的亲核氧原子与糖残基 C1 之间的共价键 C2-O-Asp257 被水解，进而形成 6-蔗果三糖 β-Fruf-(2→6)-β-Fruf-(2↔1)-α-Glcp。6-蔗果三糖在报道中属于果聚糖型的低聚果糖，由糖苷水解酶 32 家族催化产生[31]。

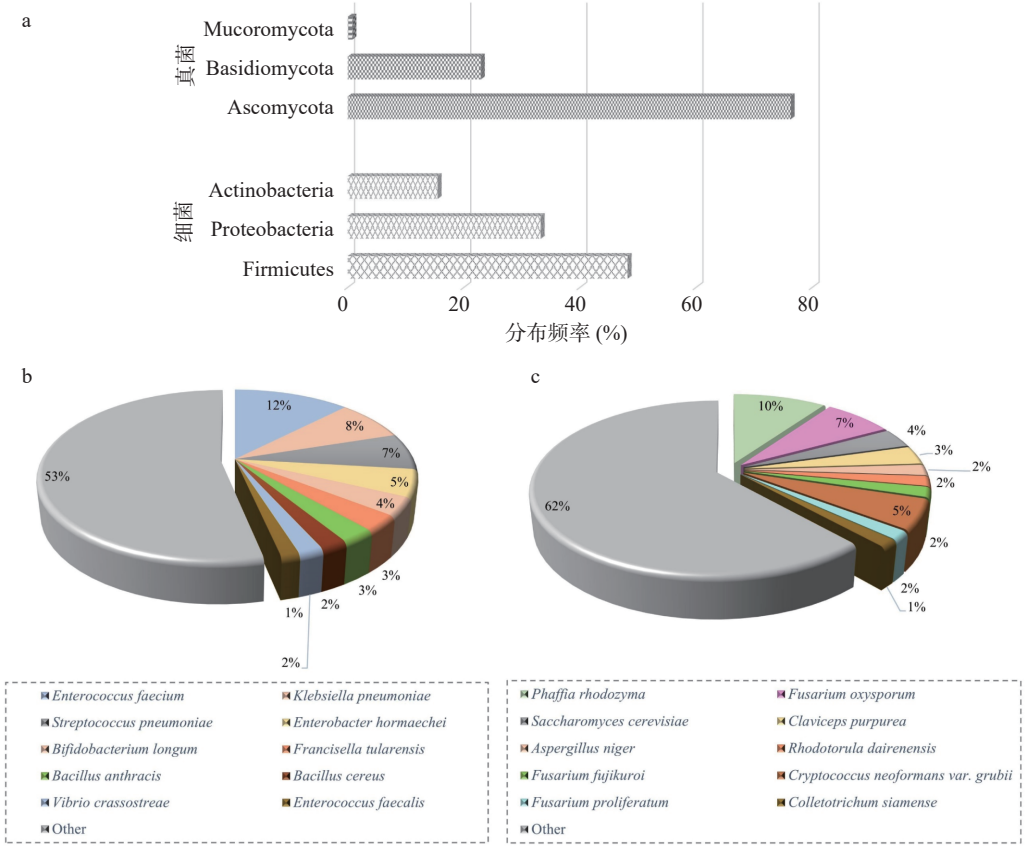
2.3　β-D-呋喃果糖苷酶序列多样性高通量分析和微生物来源预测

通过 NCBI 数据库高通量靶向挖掘 β-D-呋喃果糖苷酶，发现潜在携带该酶的微生物中，细菌源微生物高达 6007 种、真菌源 746 种。图 5a 表明门水平出现频率较高的结果，细菌门水平中厚壁菌门(Firmicutes)占比高达 48.2%，变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)分别为 33.2% 和 15.5%；真菌门水平以子囊菌门(Ascomycota)占比最高达 76.3%，担子菌门(Basidiomycota)和毛霉菌门(Mucoromycota)分别占比为 22.9% 和 0.8%。细菌种水平中具有潜在表达该酶的屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)菌株相对频率高达 12.0%(图 5b)，屎肠球菌广泛存在于自然环境，是人与动物肠道正常菌群的一部分，目前屎肠球菌广泛用来发酵乳中糖肽以及同布氏乳杆菌(*Lactobacillus buchneri*)共接种于作物中，从而达到提升乳品品质稳定性的目标[32−33]。真菌种水平中常用于发酵菌株的酵母如红法夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、*Rhodotorula dairenensis* 和黑曲霉(*Aspergillus niger*)均表现出具有潜在的表达 β-D-呋喃果糖苷酶功能特性(图 5c)。酵母、黑曲霉作为重要的发酵工业微生物广泛分布于酿造食品领域[34−35]，是生产 β-1,3/α-1,3-葡聚糖的潜在高效功能微生物。

研究对代表性菌株表达 β-D-呋喃果糖苷酶相关的氨基酸序列作系统发育分析，结果显示细菌源菌株主要分成 8 个支，其中 *Bifidobacterium longum* 和 *Klebsiella pneumoniae* 种水平的三个代表性菌株以及菌株 *Vibrio crassostreae* 8H1_4 与普沙根瘤菌(代表菌株 *Rhizobium pusense* SORGH_AS_1083)具有较近的亲缘关系，且通过数据库注释信息探究到细菌和真菌代表性菌株的酶序列主要分布于糖苷水解酶 32 家族(图 5d, 5e)。

2.4　不同微生物来源 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化效率高通量分析

研究分别对 6 株普沙根瘤菌和不同来源代表性微生物的 β-D-呋喃果糖苷酶进行以蔗糖为底物，D-葡萄糖为产物的催化性质探索并预测分析其酶催化动力学参数(k_{cat}、K_m)(表 1)。结果表明，6 株普沙根瘤菌的 β-D-呋喃果糖苷酶的 k_{cat} 值均在 97 s^{-1} 以上，催化效率(k_{cat}/K_m)在 4.77~5.51 $L\cdot mol^{-1}\cdot s^{-1}$ 之间。其中菌株 *Rhizobium pusense* SORGH_AS_1083



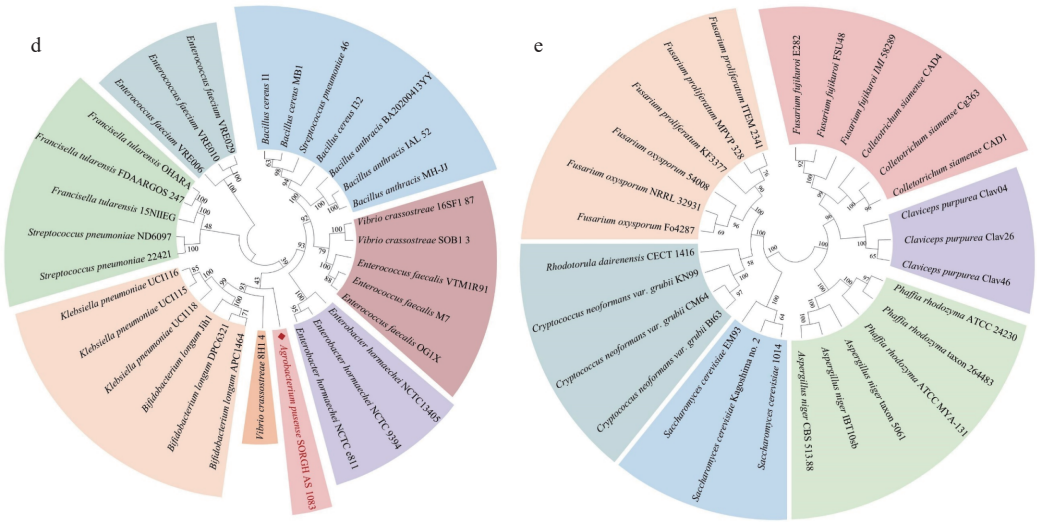


图 5 NCBI 数据库收录具有 *β*-D-呋喃果糖苷酶在微生物(细菌、真菌)中的分布

Fig.5 Distribution of *β*-D-fructofuranosidase in microorganisms (bacteria, fungi) included in NCBI database

注:(a)门水平分布频率;(b)、(c)分别为细菌、真菌种水平分布频率 top10;(d)、(e)分别为细菌、真菌源种水平 top10 中代表性菌株。

表 1 不同微生物来源的 *β*-D-呋喃果糖苷酶潜在催化性质

Table 1 Potential catalytic properties of *β*-D-fructofuranosidase derived from other microorganisms

菌株	序列ID	k_{cat} (s^{-1})	K_m ($mol·L^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($L·mol^{-1}·s^{-1}$)
普沙根瘤菌源菌株				
Rhizobium pusense CC134	MBP2610697.1	97.87	19.90	4.92
Rhizobium pusense CCGM10	OJH54235.1	99.29	20.22	4.91
Rhizobium pusense CCGM11	OJH58622.1	99.29	20.22	4.91
Rhizobium pusense SORGH_AS_1083	MDR6188921.1	109.32	19.86	5.51
Rhizobium pusense NRCPB10	OOO21329.1	99.81	20.92	4.77
Rhizobium pusense LMG 25623	SDE29890.1	99.81	20.92	4.77
细菌源代表性菌株				
Enterococcus faecium VRE006	XIQ57400.1	103.23	13.30	7.76
Enterococcus faecium VRE010	XIQ45802.1	103.23	13.30	7.76
Enterococcus faecium VRE029	XIP94265.1	103.23	13.30	7.76
Klebsiella pneumoniae UCI118	OUI64186.1	140.25	28.92	4.85
Klebsiella pneumoniae UCI115	OUI54309.1	149.95	30.57	4.91
Klebsiella pneumoniae UCI116	OUI44743.1	139.09	26.46	5.26
Streptococcus pneumoniae ND6097	CTM86144.1	135.35	31.86	4.25
Streptococcus pneumoniae 46	CKD91712.1	130.75	51.84	2.52
Streptococcus pneumoniae 22421	ODJ76475.1	122.15	27.46	4.45
Enterobacter hormaechei NCTC 9394	CBK84909.1	64.99	18.60	3.49
Enterobacter hormaechei NCTC13405	STP67288.1	75.10	23.99	3.13
Enterobacter hormaechei NCTC e811	SAG93547.1	73.92	21.07	3.51
Bifidobacterium longum Jih1	BCB69039.1	124.07	25.06	4.95
Bifidobacterium longum APC1464	PKD09525.1	119.10	25.97	4.59
Bifidobacterium longum DPC6321	PKC77516.1	114.52	23.24	4.93
Francisella tularensis FDAARGOS_247	PNM29108.1	73.18	11.19	6.54
Francisella tularensis OHARA	OCQ69246.1	105.78	9.86	10.73
Francisella tularensis 15NIIEG	QQL42852.1	113.29	10.85	10.44
Bacillus anthracis BA20200413YY	XKO78226.1	113.75	46.29	2.46
Bacillus anthracis IAL 52	XHE07578.1	113.75	46.29	2.46
Bacillus anthracis MH-JJ	XIE20426.1	113.75	46.29	2.46
Bacillus cereus MB1	UTO41323.1	130.75	61.67	2.12
Bacillus cereus I32	TKJ08114.1	133.23	51.29	2.60
Bacillus cereus I1	TEX15508.1	130.75	61.67	2.12
Vibrio crassostreae 16SF1_87	ROP20739.1	132.23	33.45	3.95
Vibrio crassostreae 8H1_4	ROO55791.1	87.68	43.01	2.04
Vibrio crassostreae SOB1_3	TWD33539.1	132.23	33.45	3.95
Enterococcus faecalis VTM1R91	SDN37709.1	111.37	19.41	5.74
Enterococcus faecalis M7	ELA04915.1	109.39	22.24	4.92
Enterococcus faecalis OG1X	ELA02140.1	109.39	22.24	4.92

续表 1

菌株	序列ID	k_{cat} (s^{-1})	K_m ($mol \cdot L^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)
真菌源代表性菌株				
Phaffia rhodozyma ATCC 24230	AFP98791.1	179.38	8.38	21.40
Phaffia rhodozyma ATCC MYA-131	ACL79833.1	165.30	8.64	19.14
Phaffia rhodozyma taxon 264483	5O47_A	184.20	8.56	21.51
Fusarium oxysporum Fo4287	KAJ9427098.1	68.33	4.75	14.37
Fusarium oxysporum 54008	EXL73886.1	75.06	4.57	16.41
Fusarium oxysporum NRRL 32931	EWZ01227.1	72.33	4.66	15.53
Saccharomyces cerevisiae 1014	KAJ1545737.1	72.92	11.32	6.44
Saccharomyces cerevisiae EM93	KAJ1535746.1	68.76	12.92	5.32
Saccharomyces cerevisiae Kagoshima no. 2	GAX71838.1	82.26	12.63	6.51
Claviceps purpurea Clav04	KAG6317355.1	96.22	15.84	6.07
Claviceps purpurea Clav26	KAG6312956.1	103.99	16.80	6.19
Claviceps purpurea Clav46	KAG6294402.1	100.16	13.94	7.19
Aspergillus niger taxon 5061	BAB67771.1	183.69	10.00	18.36
Aspergillus niger IBT10sb	AAC08047.1	156.04	9.85	15.85
Aspergillus niger CBS 513.88	CAK45778.1	181.04	8.24	21.97
Rhodotorula dairenensis CECT 1416	QFG75712.1	89.91	10.33	8.70
Fusarium fujikuroi IMI 58289	XP_023436866.1	80.69	2.94	27.40
Fusarium fujikuroi E282	SCN98742.1	95.17	3.90	24.40
Fusarium fujikuroi FSU48	SCV49301.1	95.17	3.90	24.40
Cryptococcus neoformans var. grubii KN99	AUB23796.1	85.94	7.05	12.19
Cryptococcus neoformans var. grubii Bt63	OXM80191.1	130.62	4.86	26.89
Cryptococcus neoformans var. grubii CM64	OXH72680.1	130.62	4.85	26.94
Fusarium proliferatum MPVP 328	KAG4285994.1	79.26	4.87	16.26
Fusarium proliferatum KF3377	KAG4268311.1	101.82	4.84	21.05
Fusarium proliferatum ITEM 2341	RBA20836.1	100.43	5.21	19.27
Colletotrichum siamense Cg363	KAF5517067.1	75.98	3.10	24.53
Colletotrichum siamense CAD1	KAF4876674.1	78.66	4.27	18.42
Colletotrichum siamense CAD4	KAF4848634.1	83.06	3.74	22.22

(序列 ID: MDR6188921)的潜在催化效率最高。分析其他非普沙根瘤菌源的微生物来源酶潜在催化效率，细菌代表性菌株 *Francisella tularensis* OHARA 的 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化效率相对于其他细菌代表性菌株催化效率最高，约为 10.73 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$。真菌微生物来源代表性菌株的 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化效率普遍高于普沙根瘤菌源酶，特别是 *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 菌株的 β-D-呋喃果糖苷酶潜在催化效率最高，约为 27.40 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$。

研究分别选择该酶催化效率最高的代表性氨基酸序列进行三维结构建模，并与普沙根瘤菌来源的该酶催化效率最高者(*Rhizobium pusense* SORGH_AS_1083)进行三维结构分析(图 6a)，结果表明三者结构间重叠性较高。“5 叶”β 螺旋活性结构相似性较强，且内部催化核心位点 Asp 虽在原序列位置不同，但在三维空间结构处相对位置一致，结果表明 β-D-呋喃果糖苷酶催化活性中心的保守性。对该酶“5 叶”β 螺旋活性腔体结构分析，表明三者的催化腔体存在一定差异，尤其是催化效率最高的真菌源代表性菌株 *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 的酶催化腔体长度相对较长，为 18.053 Å，其腔体最窄处(瓶颈)半径同样也相对较长，为 1.156 Å，较大的催化腔体结构可能更有利于底物的进入和产物的释放，而且其吞吐率也在三者中最高(图 6b)。

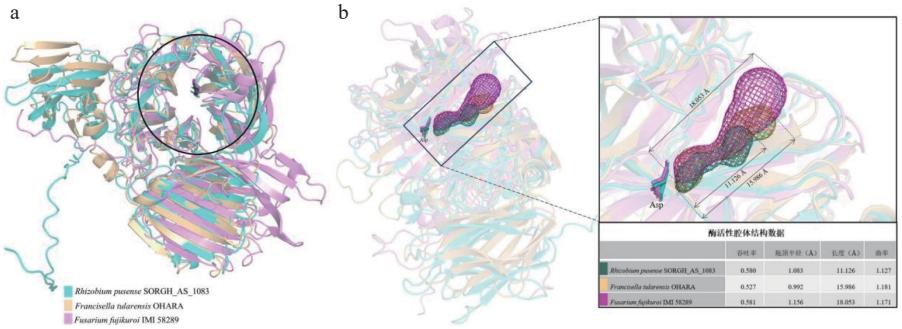


图 6　不同微生物源 β-D-呋喃果糖苷酶的结构比较

Fig.6　Structural comparison of β-D-fructofuranosidases from different microbial sources

注：(a)三种代表性微生物 β-D-呋喃果糖苷酶序列结构叠式分析；(b)三种代表性微生物酶活性腔体结构分析。

通过数据库高通量靶向挖掘具有表达 β-D-呋喃果糖苷酶功能的潜在微生物并结合生物信息学探究其催化活性具有高效性，为后续的功能微生物筛选提供指导，但研究具有一定的局限性，需要后续生化和发酵实验的进一步证实。数据库和现有研究的局限性，例如依据数据库注释信息和序列相似性挖掘 β-D-呋喃果糖苷酶时一些菌株的该酶信息会被注释为 β-D-呋喃果糖苷酶前体（beta-fructofuranosidase precursor），而目前研究尚未对该菌株表达的 β-D-呋喃果糖苷酶具体氨基酸序列进行分析。但上述局限性并不能排除该系列菌株具有表达 β-D-呋喃果糖苷酶功能。

3 结论

本文明晰普沙根瘤菌的 β-1,3/α-1,3-葡聚糖代谢合成途径，聚焦代谢合成第一步的关键酶，建立生物信息学高通量分析方法，通过对多株普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶的序列和结构特征进行详细对比，发现其具有高度保守性。通过对酶的结构模拟和分子机制解析，确定了普沙根瘤菌源 β-D-呋喃果糖苷酶的活性区域关键位点 Tyr196 和 Asp257 与蔗糖底物分子能够有很好的相互作用。6 株普沙根瘤菌的 β-D-呋喃果糖苷酶的生信分析催化效率（k_{cat}/K_m）在 4.77~5.51 $L\cdot mol^{-1}\cdot s^{-1}$ 之间。

除普沙根瘤菌外其他微生物基因组同样具有表达 β-D-呋喃果糖苷酶的编码基因，且部分微生物携带潜在的高催化活力的酶。经数据库高通量靶向挖掘，发现含有潜在表达 β-D-呋喃果糖苷酶的微生物来源中细菌源高达 6007 株、真菌源 746 株。其中，代表性细菌菌株 *Francisella tularensis* OHARA 和真菌菌株 *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 的 β-D-呋喃果糖苷酶生信分析催化效率相对较高，分别约为 10.73 和 27.40 $L\cdot mol^{-1}\cdot s^{-1}$。进一步分析表明，导致其催化效率存在差别的可能原因，是由于不同来源的 β-D-呋喃果糖苷酶的活性腔体空间大小、瓶颈半径存在差异。本研究有助于为高效代谢合成 β-1,3/α-1,3-葡聚糖功能微生物的挖掘指明方向，并为基于合成生物学的 β-1,3/α-1,3-葡聚糖细胞工厂的构建提供生物元件。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

［1］ 食品安全标准与监测评估司. 解读《关于 β-1, 3/α-1, 3-葡聚糖等 6 种“三新食品”的公告》（2021 年第 5 号）[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(3): 350, 368. ［Department of Food Safety Standards and Monitoring Evaluation. Interpretation of the "announcement on six 'new food ingredients, new food additives and new food-related products' including β-1,3-/α-1,3-glucan" (No.5 in 2021)[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(3): 350, 368.］

［2］ 赵娟, 刘元法, 晨光, 等. β-1, 3/α-1, 3-葡聚糖与益生菌复配物的润肠通便功能[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(3): 88−92. ［ZHAO Juan, LIU Yuanfa, CHEN Guang, et al. Laxative function of β-1, 3/α-1, 3-glucan combined with probiotics[J]. Food Research and Development, 2024, 45(3): 88−92.］

［3］ XIU Aihui, KONG Yi, ZHOU Mengyi, et al. The chemical and digestive properties of a soluble glucan from *Agrobacterium* sp. ZX09[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82(3): 623−628.

［4］ ZHANG B, ZHANG Z, LYU X, et al. Structural characterization of a water-soluble and antimicrobial β-glucan secreted by Rhizobium pusense[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(4): 318−325.

［5］ LAROCHE C, MICHAUD P. New developments and prospective applications for beta (1, 3) glucans[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2007, 1(1): 59−73.

［6］ 冯玄. β-(1→3)-葡聚糖结构和功能的分子动力学模拟研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2022. ［FENG X. Molecular dynamic simulation: structure and function of β-(1→3)-glucans[D]. Beijing: University of Science and Technology of China, 2022.］

［7］ ZHOU Mengyi, PU Chuanliang, XIA Lin, et al. Salecan diet increases short chain fatty acids and enriches beneficial microbiota in the mouse cecum[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 102: 772−779.

［8］ ZHANG Ying, XIA Lin, PANG Wenqiang, et al. A novel soluble β-1, 3-D-glucan salecan reduces adiposity and improves glucose tolerance in high-fat diet-fed mice[J]. The British Journal of Nutrition, 2013, 109(2): 254−262.

［9］ IANCHIS R, ALEXA R L, GIFU I C, et al. Novel green crosslinked salecan hydrogels and preliminary investigation of their use in 3D printing[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(2): 373.

［10］ HU Xinyu, WANG Yongmei, ZHANG Liangliang, et al. Redox/pH dual stimuli-responsive degradable Salecan-g-SS-poly(IA-*co*-HEMA) hydrogel for release of doxorubicin[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 242−251.

［11］ QI Xiaoliang, WEI Wei, SHEN Jianliang, et al. Salecan polysaccharide-based hydrogels and their applications: A review[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(16): 2577−2587.

［12］ XI X, YIJIAN D, YUNXIA Y, et al. β-glucan Salecan improves exercise performance and displays anti-fatigue effects through regulating energy metabolism and oxidative stress in mice[J]. Nutrients, 2018, 10(7): 858.

［13］ XU X D, XU X, ZHONG K X, et al. Salecan ameliorates LPS-induced acute lung injury through regulating Keap1-Nrf2/HO-1 pathway in mice[J]. International Immunopharmacology, 2024, 128(1): 111512.

［14］ SUN Q, XU X, YANG X, et al. Salecan protected against concanavalin A-induced acute liver injury by modulating T cell immune responses and NMR-based metabolic profiles[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2017, 317(1): 63−72.

［15］ GAO Y, SUN Q, YANG X, et al. Orally administered salecan ameliorates methotrexate-induced intestinal mucositis in mice[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2019, 84(1): 105−116.

［16］ KOTWAL S M, SHANKAR V. Immobilized invertase[J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(4): 311−322.

［17］ TARKOWSKI Ł P, TSIRKONE V G, OSIPOV E M, et al. Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* neutral invertase 2[J]. Acta Crystallographica Section F, 2020, 76(3): 152−157.

［18］ XIE Jin, HU Haixi, CAI Kun, et al. Structural and enzymatic analyses of *Anabaena* heterocyst -specific-specific alkaline invertase InvB[J]. FEBS Letters, 2018, 592(9): 1589−1601.

［19］ TONOZUKA T, KITAMURA J, NAGAYA M, et al. Crystal structure of a glycoside hydrolase family 68 β-fructosyltransferase from *Beijerinckia indica* subsp. indica in complex with fructose[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2020, 84(12): 2508−2520.

［20］ LAMMENS W, Le ROY K, SCHROEVEN L, et al. Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: Functional implications[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(3): 727−740.

［21］ 霍润甜，夏伟，刘展志，等. 节杆菌（*Arthrobacter* sp.）EpRS66 β-呋喃果糖苷酶重组表达及酶促合成低聚乳果糖[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3398−3408.［HUO R T, XIA W, LIU Z Z, et al. Recombinant expression of β-fructofuranosidase from *Arthrobacter* sp EpRS66 and enzymatic synthesis of lactosucrose [J]. Microbiology bulletin, 2024, 51(9): 3398−3408.］

［22］ KROLL A, ROUSSET Y, HU Xiaopan, et al. Turnover number predictions for kinetically uncharacterized enzymes using machine and deep learning[J]. Nature Communications, 2023, 14: 4139.

［23］ 姚睿, 赵丽婷, 陈磊, 等. 利用蔗糖产尿苷二磷酸葡萄糖的大肠杆菌构建[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 9−18.［YAO Rui, ZHAO Liting, CHEN Lei, et al. Construction of *Escherichia coli* producing uridine diphosphate glucose from sucrose[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(22): 9−18.］

［24］ TAKAGI A, TAGAMI T, OKUYAMA M. Mutant β-fructofuranosidase synthesizing blastose［β-D-Fruf-(2→6)-D-Glcp］[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2024, 180(1): 110500.

［25］ BUJACZ A, JEDRZEJCZAK - KRZEPKOWSKA M, BIELECKI S, et al. Crystal structures of the apo form of β - fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* and its complex with fructose[J]. The FEBS Journal, 2011, 278(10): 1728−1744.

［26］ MIYAZAKI T, OBA N, PARK E Y. Structural insight into the substrate specificity of *Bombyx mori* β-fructofuranosidase belonging to the glycoside hydrolase family 32[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2020, 127(1): 103494.

［27］ RODRIGO-FRUTOS D, JIMéNEZ-ORTEGA E, PIEDRABUENA D, et al. New insights into the molecular mechanism behind mannitol and erythritol fructosylation by β-fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis*[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 7158.

［28］ CHU Jianlin, TIAN Yani, LI Qian, et al. Engineering the β-fructofuranosidase Fru6 with promoted transfructosylating capacity for fructooligosaccharide production[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(31): 9694−9702.

［29］ LAIRSON L L, HENRISSAT B, DAVIES G J, et al. Glycosyltransferases: Structures, functions, and mechanisms[J]. Annual Review of Biochemistry, 2008, 77: 521−555.

［30］ ÁLVARO-BENITO M, SAINZ-POLO M A, GONZÁLEZ-PÉREZ D, et al. Structural and kinetic insights reveal that the amino acid pair gln-228/asn-254 modulates the transfructosylating specificity of *Schwanniomyces occidentalis* β-fructofuranosidase, an enzyme that produces prebiotics[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(23): 19674−19686.

［31］ PORRAS-DOMÍNGUEZ J R, ÁVILA-FERNÁNDEZ Á, RODRÍGUEZ-ALEGRÍA M E, et al. Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(5): 783−790.

［32］ 李树勋. 屎肠球菌 AS8 发酵乳中糖肽的结构表征及抗氧化特性研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学, 2024.［LI S X. Structural characterisation and antioxidant properties of glyeopeptides in fermented milkfrom *Enterococeus faecium* AS8[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2024.］

［33］ 郑晓凯, 付彦博, 杨寒珺, 等. 饲用油菜中优势乳酸菌的分离鉴定及其对青贮发酵品质和有氧稳定性的影响[J]. 动物营养学报 , 2024, 36(8): 5411−5421.［ZHENG Xiaokai, FU Yanbo, YANG Hanjun, et al. Isolation and identification of dominant lactic acid bacteria from *Brassica napus* and their effects on fermentation quality and aerobic stability of silage[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(8): 5411−5421.］

［34］ BO Tao, ZHANG Jiaojiao, ZONG Enxiang, et al. Selective elucidation of living microbial communities in fermented grains of Chinese Baijiu: Development of a technique integrating propidium monoazide probe pretreatment and amplicon sequencing[J]. Foods, 2024, 13(11): 1782.

［35］ ZONG Enxiang, BO Tao, DANG Ling, et al. Different functions can be provided by low temperature Daqu with different appearance features due to variations in the microbial community structure during fermentation[J]. LWT, 2024, 193: 115763.