李梦丽, 张刘浩, 韩学艳, 等. 理性设计提高 *Streptococcus troglodytae* 果糖基转移酶的酶活力及热稳定性 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(17): 244−252. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090360
LI Mengli, ZHANG Liuhao, HAN Xueyan, et al. Rational Design for Improved Enzymatic Activity and Thermostability of *Streptococcus troglodytae* Fructosyltransferase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(17): 244−252. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090360

·生物工程·

理性设计提高 *Streptococcus troglodytae* 果糖基转移酶的酶活力及热稳定性

李梦丽[1], 张刘浩[1], 韩学艳[1], 姚佳微[1], 张　涛[1,2,*]
(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;
2.山东省功能糖生物制备与应用技术重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘　要: 本研究通过基因挖掘技术筛选出一种穴居链球菌（*Streptococcus troglodytae*）来源的新型果糖基转移酶（StFFase），采用计算机辅助理性设计对其进行分子改造研究，以提升其催化活力及热稳定性。基于 EVCoupling 预测及实验验证，从潜在突变体中筛选出三个酶活显著提升的突变体：D104E、I232S 和 S684P，其酶活力分别为野生型的 2.20、2.65 和 1.53 倍。特别地，I232S 在 40~70 ℃ 范围内均保持较高的相对酶活，在 50 ℃ 下的半衰期延长至 6.60 h，表现出优异的热稳定性。动力学分析显示，I232S 对底物蔗糖的亲和力提高（K_m 降低至 171 mmol/L），催化效率显著增强。此外，该突变体在 50% 蔗糖浓度（w/w）及 15 U/g 蔗糖加酶量条件下，蔗果三糖转化率达 42.17%。结构模拟表明，突变通过消除静电排斥（D104E）、形成新氢键（I232S）及稳定 *β*-转角构象（S684P），增强了酶的催化性能与热稳定性。本研究为果糖基转移酶的理性设计提供了新策略，并凸显了其在果寡糖工业化生产中的应用潜力。

关键词: 果糖基转移酶, 理性设计, 酶活力, 热稳定性, 结构解析, 蔗果三糖
中图分类号: Q814　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)17−0244−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025090360
本文网刊:

Rational Design for Improved Enzymatic Activity and Thermostability of *Streptococcus troglodytae* Fructosyltransferase

LI Mengli[1], ZHANG Liuhao[1], HAN Xueyan[1], YAO Jiawei[1], ZHANG Tao[1,2,*]
(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2.Shandong Key Laboratory of Biological Preparation and Application Technology for Functional Glycomics, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, a novel fructosyltransferase (StFFase) was screened from *Streptococcus troglodytae* through gene mining. The enzyme was then engineered via computer-aided rational design to improve both its catalytic efficiency and thermostability. Based on EVCoupling predictions and experimental validation, three mutants (D104E, I232S, and S684P) with significantly enhanced enzymatic activity were selected from potential candidates. Their enzymatic activities were 2.20, 2.65, and 1.53 times that of the wild-type, respectively. Notably, the I232S mutant maintained high relative enzyme activity over a temperature range of 40~70 ℃, and its half-life at 50 ℃ was extended to 6.60 h, demonstrating superior thermostability. Kinetic analysis revealed that the I232S mutant exhibited improved affinity for the substrate sucrose, with the K_m value decreasing to 171 mmol/L, and a significantly enhanced catalytic efficiency. Furthermore, a conversion rate of 42.17% for 1-kestose was achieved using this mutant under conditions of 50% sucrose concentration (w/w) and an enzyme dosage of 15 U/g sucrose. Structural simulations revealed that the mutations improved catalytic performance and thermosta-

收稿日期: 2025−10−10
基金项目: 山东省重点研发计划（竞争性创新平台）（2022CXPT018）。
作者简介: 李梦丽（1993−）, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: 8202306021@jiangnan.edu.cn。
*** 通信作者:** 张涛（1973−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zhangtao@jiangnan.edu.cn。

bility by eliminating electrostatic repulsion (D104E), forming new hydrogen bonds (I232S), and stabilizing β-turn conformations (S684P). This study provides a new strategy for the rational design of fructosyltransferases and highlights the potential of the engineered enzyme for industrial fructooligosaccharide production.

Key words: fructosyltransferase; rational design; enzyme activity; thermostability; structural analysis; 1-kestose

果糖基转移酶（Fructosyltransferase, FFase, EC 2.4.1.9）是一类催化果糖基转移反应的关键酶系，在自然界碳源代谢、功能性碳水化合物合成及生物抗逆响应中扮演核心角色[1]。该类酶通过水解蔗糖释放果糖基，并将其转移至受体分子如蔗糖，生成低聚果糖（Fructooligosaccharides, FOS）和果聚糖聚合物[2]。这些 FOS 包含蔗果三糖（GF2）、蔗果四糖（GF3）、蔗果五糖（GF4）等。FOS 作为低热量、非消化性膳食纤维，已被全球多国认证为安全功能性配料（如美国 FDA 的 GRAS 认证、欧盟 EFSA 健康声称），其益生元特性可促进双歧杆菌增殖，并赋予宿主抗糖尿病、降血脂、免疫调节、抗龋齿及肠道微生态平衡等多重健康益处，被欧洲学者誉为“感觉愉快因子”[3−5]。

目前，利用酶生物催化技术，以蔗糖为底物合成 FOS，被视为提升 FOS 产量的一条高效策略。近年来，针对果糖基转移酶的酶源发掘工作已逐步深入，多种细菌来源的果糖基转移酶已被成功克隆与表征，例如罗伊氏乳杆菌 121（*Lactobacillus reuteri* 121）[6]、解淀粉欧文氏菌（*Erwinia amylovora*）[7]、运动假单胞菌（*Zymomonas mobilis*）[8]、布雷氏菌属（*Brenneria* sp. EniD312）[9] 以及解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）[10] 等。已报道的 FFase 的适应范围较宽，介于 20~65 ℃ 之间。例如，*Bacillus* sp. TH4-2 来源的 FFase 最适温度为 60 ℃[11]，而 *Z. mobilis* 来源的 FFase 最适温度最低，仅为 23 ℃[8]。近期从 *Pseudomonas orientalis* 中筛选获得的 FFase 在 65 ℃ 时仍表现出最大酶活，显著高于大多数已报道的 FFase[12]。在 pH 适应性方面，大多数 FFase 在弱酸性区间（pH5.0~6.5）活性较高，但部分酶亦表现出一定的碱性耐受能力。例如，来源于 *Bacillus aryabhattai* GYC2-3 的 FFase 在 pH8.0 时表现出最高酶活力[13]；同样，*Bacillus licheniformis* 来源的 FFase 在 pH8.0 达到最适催化活性[14]，而 *Bacillus subtilis* NRC16 的 FFase 在 pH8.2 时显示出最大相对酶活[15]。在酶活力方面，野生型 FFase 生产菌株的产酶能力普遍有限，初步筛选所得菌株往往酶产量低、催化活力不足，严重制约 FOS 的工业化生产进程。因此，进一步挖掘更多高性能的新型 FFase 资源，并借助酶工程手段提升其催化效率与稳定性，对于突破该酶的技术瓶颈、深入解析其催化机制以及推动其工业应用，具有重要的研究意义与实用价值。

本研究通过基因挖掘筛选出一种 *S. troglodytae* 来源的果糖基转移酶，并采用计算机辅助理性设计对其进行分子改造，以提升酶活力和热稳定性。对所得突变体的酶活性与生化性质进行表征，并基于结构预测分析酶活提升的机制。该研究为酶的理性设计提供了有效策略，并阐明了突变体在蔗果三糖工业化生产中的应用潜力。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

限制性内切酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 高保真酶、无缝克隆试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒　南京诺唯赞生物科技股份有限公司；*E. coli* DH5α 感受态细胞、*E. coli* BL21（DE3）细胞　生工生物工程（上海）股份有限公司；蔗果三糖、蔗果四糖　色谱纯，上海麦克林生化科技股份有限公司；引物合成及质粒测序　天霖生物科技（无锡）有限公司；其他所有化学品均为国药集团化学试剂有限公司（中国上海）。

T100 PCR 仪、Wide Mini-sub cell GT 核酸电泳仪　美国伯乐公司；Scientz-IID 细胞破碎机　新芝生物科技有限公司；Centrifuge 5804R 高速冷冻离心机　德国 Eppendorf 公司；GI54DWS 立式高压灭菌锅　厦门致微仪器有限公司；BI-150A 恒温培养箱　上海精宏实验设备有限公司；Sepax HP-Amino 色谱柱　苏州赛分科技股份有限公司；Waters 2695 高效液相色谱仪　上海沃特世（Waters）科技有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　果糖基转移酶的筛选及突变位点选择　借助 Enzyme Miner 在线服务器（https: //loschmidt.chemi.muni.cz/enzymeminer/custom-sequences）进行基因挖掘。以已报道 *Bacillus subtilis*（WP153256516.1）来源的 FFase 序列为探针，将关键催化残基（Asp-Asp-Glu）作为过滤条件，去排除检索结果中关键氨基酸不匹配的序列。最后综合考虑预测蛋白与模板的相似度（设为 30%~80%）、预测蛋白的可溶性（阈值设为>0.5）以及微生物来源等因素，筛选了 10 种来源的 FFase 进行基因表达和发酵酶活力测定，选取高酶活力来源的 FFase 进行分子改造研究。

利用在线服务器 EVCoupling（https://v2.evcouplings.org/）进行突变预测，将来源于 *S. troglodytae* 的果糖基转移酶的氨基酸序列进行进化偶联分析，以评估点突变对 StFFase 折叠自由能（$\Delta\Delta G$）的影响。$\Delta\Delta G \geqslant 0.5$ kcal·mol^{-1}（$\Delta\Delta G = \Delta G$ 野生型 $- \Delta G$ 突变型）的氨基酸被确定为潜在的突变位点。

1.2.2　突变体重组菌株的构建　将 1.2.1 中筛选的突变点进行突变质粒构建。通过一步法 PCR 反应实

现定点突变，采用表 1 中互补的寡核苷酸序列引物。重组质粒 pET-22b-StFFase 委托天霖生物科技（无锡）有限公司合成。质粒 pET-22b-StFFase 被用作突变模板。PCR 循环参数设置和程序遵循 Mut Express Universal Fast Mutagenesis Kit 产品的说明。为去除甲基化模板质粒，纯化的 PCR 产物进行 *Dpn* I 消化，置于 37 ℃ 恒温反应 30 min。线性质粒经重组环化后转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞。经抗性筛选获得的阳性转化子需进行 DNA 测序以确认突变准确性。验证后的突变质粒被转化到 *E. coli* BL21（DE3）细胞中，通过氨苄青霉素（浓度为 100 μg/mL）筛选获得突变体菌株。

表 1 突变质粒引物设计

Table 1 Design of mutant plasmid primers

引物	序列（5’—3’）
D104E_F	GACCAACgaaAAAGCGAAGGCGAGCAAAGAGA
D104E_R	TCGCTTTttcGTTGGTCTGACCTACTTCAGAGGTG
H165T_F	GGTaccCAGATGACCTACCAGGAGTTTGATAA
H165T_R	TAGGTCATCTGggtACCGGTCTGTGCGTCAGAGG
Q170K_F	CCAGATGACCTACaaaGAGTTTGATAAAATCGC TCAGACCC
Q170K_R	CtttGTAGGTCATCTGGTGACCGGTCTGTGCG
I232S_F	CGAAGTTagcAACTGGAACGGCTACCAACTGG
I232S_R	TCCAGTTgctAACTTCGCCGGTTTTAGCATCT
I232A_F	CGAAGTTgcgAACTGGAACGGCTACCAACTGG
I232A_R	TCCAGTTcgcAACTTCGCCGGTTTTAGCATCT
I232V_F	CGAAGTTgtgAACTGGAACGGCTACCAACTGG
I232V_R	TCCAGTTcacAACTTCGCCGGTTTTAGCATCT
E295K_F	TAACaaaGATGGCTCCCTGCAGCTGTTCTACA
E295K_R	GGGAGCCATCtttGTTAACAGTTGCGGAACCGG
E295S_F	TGTTAACagcGATGGCTCCCTGCAGCTGTTCT
E295S_R	AGCCATCgctGTTAACAGTTGCGGAACCGGAC
L299I_F	TGGCTCCattCAGCTGTTCTACACCAAGGTCG
L299I_R	ACAGCTGaatGGAGCCATCTTCGTTAACAGTTG
V323L_F	ACTGCAACCctgAACCTGGGTTTCGACGATCA
V323L_R	AGGTTcagGGTTGCAGTTGCCAGACGTTGGTT
K381D_F	AGACGAAgatGGCGATCGTTACCTGGTTTTCG
K381D_R	GATCGCCatcTTCGTCTTCAATCACGTGCGGG
K381N_F	AGACGAAaacGGCGATCGTTACCTGGTTTTCG
K381N_R	GATCGCCgttTTCGTCTTCAATCACGTGCGGG
K449E_F	GGTGACgaaAAAACTCCAGAAGTTGATCAATTTTATAC
K449E_R	GGAGTTTTttcGTCACCTTTCAGTTTCAGAATGCC
T465P_F	GTCTAGCccgATGGTGAGCGATGAACTGGAAC
T465P_R	TCACCATcggGCTAGACAGCAGCGGGGTATAA
Q520N_F	ATCCGATaacCTGACCAACGGTTACAAACCGC
Q520N_R	TGGTCAGgttATCGGATACGTAACCCAGCATG
Q520S_F	ATCCGATagcCTGACCAACGGTTACAAACCGC
Q520S_R	TGGTCAGgctATCGGATACGTAACCCAGCATG
N523S_F	CTGACCagcGGTTACAAACCGCTGAACAACTC
N523S_R	TTGTAACCgctGGTCAGCTGATCGGATACGTAAC
N523G_F	TGACCggcGGTTACAAACCGCTGAACAACTCC
N523G_R	TTTGTAACCgccGGTCAGCTGATCGGATACGTAAC
M564V_F	TCTGCTGgtgACTGCTTATATGACTAACCGCAACG
M564V_R	AAGCAGTcacCAGCAGAGTGTCAGAAGAGCCC
M654I_F	ACTCCGGGCattTACCAGCCAACCGTACCTTCTAC
M654I_R	TGGTAaatGCCCGGAGTATGCGGTTTCAGGCC
S684P_F	CTGGTTATCAAAccgGTAAAAGTGAACAACAA CGACTCTGC
S684P_R	ACcggTTTGATAACCAGATGACCGTCGAAGGA

注：小写字母为突变位点。

1.2.3 酶的表达纯化 将 1.2.2 中构建的突变体菌株在 LB 液体试管中 37 ℃、200 r/min 培养过夜，获得种子液。将种子液以 3%（v/v）的接种量接入 LB 培养基，在 200 r/min 和 37 ℃ 下培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8，加入 0.3 mmol/L IPTG 后在 20 ℃ 下诱导培养 20 h，获得发酵菌体。

收集的菌体经 8000×g 离心 10 min 后，用裂解缓冲液（50 mmol/L NaCl，100 mmol/L Tris-HCl，pH7.0）重悬，使用超声破碎仪裂解细胞（工作 1 s/间歇 2 s，20 min）。细胞裂解液经 8000×g 离心 10 min 后收集上清液，得到粗酶液。在 4 ℃ 条件下进行 Ni-NTA 亲和层析：首先，上清液加载到 Ni-NTA 树脂亲和柱上，使用 2 个柱体积的结合缓冲液（500 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl，pH7.0）平衡。之后，使用洗涤缓冲液（500 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L 咪唑，pH7.0）洗涤去污蛋白。最后，通过洗脱缓冲液（500 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl，500 mmol/L 咪唑，pH7.0）获得目标蛋白。将洗脱液装入 10 kDa 截留分子量的透析袋，先在透析缓冲液 A（10 mmol/L EDTA·2Na，50 mmol/L Tris，pH7.0）中于 4 ℃ 透析 18 h，每 6 h 换一次新缓冲液 A，以去除咪唑和金属离子。再换到透析缓冲液 B（50 mmol/L Tris，pH7.0）中，同样条件下透析 18 h，每 6 h 更换一次缓冲液 B。透析完成后，收集纯酶液至 10 mL EP 管中，4 ℃ 保存备用。对纯酶液进行适当稀释后，按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的操作说明，进行重组酶浓度的测定。

1.2.4 酶活力测定及寡糖产物定量检测 酶活定义（U）：标准反应条件下，单位时间（min）催化蔗糖合成 1 μmol 蔗果三糖所需的酶量。

$$\text{发酵酶活(U/mL)} = \frac{\text{蔗果三糖含量(μg/mL)} \times \text{稀释倍数} \times \text{反应体系(mL)}}{\text{蔗果三糖分子量} \times \text{反应时间(min)} \times \text{发酵液体积(mL)}}$$

相对酶活：酶在特定条件下的催化活性相对于某个标准酶的催化活性的比值。以某个标准酶的活力为参照，将其相对活力定义为 100%。

酶反应体系总体积为 1 mL，将 0.9 mL 蔗糖溶液（100 g/L，使用 50 mmol/L，pH6.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制）于 50 ℃ 振荡水浴中预热 10 min，加入 0.1 mL 纯酶液或 0.1 mL 全细胞液。反应在 50 ℃ 恒温水浴中进行 20 min，结束后立即于沸水浴中加热 10 min 以终止。

将灭活的反应体系 12000 r/min 离心 5 min，0.22 μm 有机膜过滤，利用 HPLC 检测蔗糖，以及果糖、葡萄糖、蔗果三糖和蔗果四糖的生成量。HPLC 检测条件：示差折光检测器；色谱柱为 Sepax HP-Amino（4.6 mm×250 mm），柱温为 30 ℃；流动相为乙腈-超纯水（3∶1，v/v），等度洗脱，流速为 1 mL/min；进样量为 10 μL。

1.2.5　重组酶的酶学性质研究

1.2.5.1　最适温度及热稳定性　温度对酶活力的影响：在不同温度下（40、45、50、55、60、65 和 70 ℃）测定酶活性以确定最佳温度（Topt）。最适温度是指酶活力最高时所对应的温度，并将此条件下的酶活力设定为 100%。采用半衰期（$t_{1/2}$）来表征重组酶和突变体的热稳定性。将酶置于 50、60 和 70 ℃ 环境中孵育 2 h，期间每间隔 0.5 h 取一次样。实验以在最适宜条件下，保温时长为 0 h 的酶液活性作为参照标准，将其设定为相对酶活力的 100%。

1.2.5.2　最适 pH　分别配制浓度为 50 mmol/L 的醋酸钠缓冲液（pH5.0~6.0）、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（pH6.0~7.5）和 Tris-HCl 缓冲液（pH7.5~9.0）。测定 StFFase 和突变体的酶活力，酶活力最高时所对应的 pH 被定义为最适反应 pH，并将此条件下的酶活力设定为 100%。

1.2.5.3　金属离子对酶活力的影响　为探究常见二价金属离子对酶活性的影响，向反应体系中分别加入终浓度为 1 mmol/L 的 Mg^{2+}、Co^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}、Ca^{2+}和 Fe^{2+}。以未添加金属离子的酶液活性为对照（100%），研究各离子的作用效果。

1.2.5.4　动力学参数　通过测定不同底物浓度的蔗糖（100~800 mmol/L）的反应速率来确定 StFFase 和突变体的动力学参数。实验数据经 OriginPro 9.0 软件进行非线性回归分析，根据 Michaelis-Menten 方程计算确定米氏常数（K_m）和催化速率常数（k_{cat}）[16]。

1.2.6　分子对接及突变酶的结构分析　以 AlphaFold 2 数据库中的 P11701.1 为模板，使用 SWISS-MODEL 服务器预测 StFFase 的 3D 结构。使用拉氏构象图（Ramachandran plot）验证模型的合理性。从 PubChem 化合物数据库中获得配体蔗糖的分子结构，采用 AutoDock Vina 1.2.2 进行分子对接，网格中心定位于底物结合口袋，计算氢键、疏水作用及盐桥等结合自由能。使用 Pymol 软件对蛋白结构进行可视化和突变位点之间相互作用模式分析。

1.2.7　酶法合成蔗果三糖　使用最佳突变体，以质量分数 50% 的蔗糖为底物，选择加酶量 15 U/g 蔗糖进行转化反应，50 ℃、pH7.0、180 r/min 的条件下间隔取样，测定转化液中蔗果三糖的含量和转化率。

$$蔗果三糖转化率(\%)=\frac{蔗果三糖的质量}{初始蔗糖总质量}\times 100$$

1.3　数据处理

采用 Origin Pro 2018 软件对数据进行绘图及分析，所有实验均重复三次，结果以平均值±标准差（SD）表示。多组比较采用单因素方差分析加 LSD 检验，显著性水平设为 $P<0.05$。

2　结果与分析

2.1　果糖基转移酶的基因挖掘及序列分析

使用 Enzyme Miner 对 FFase 进行基因挖掘，选择了分别来源于细菌 *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026（LjFFase，AEB93562.1）、*S. troglodytae*（StFFase，BAQ25176.1）、*Glutamicibacter halophytocola*（GhFFase，WP_060701086.1）、*Arthrobacter* sp. S41（AsFFase，TAP26048.1）、*Vibrio natriegens*（VnFFase，WP_065300568.1）、*Microbacterium saccharophilum*（MsFFase，WP_244946418.1）、*Arthrobacter pascens*（ApFFase，WP_307075722.1）、*Bacillus tropicus*（BtFFase，QIE35524.1）、*Candidatus Companilactobacillus pullicola*（CCpFFase，HIY92658.1）和 *Burkholderia cepacia*（BcFFase，QFS39460.1）的 FFase 酶基因。为获得高产 FFase 酶菌株，对上述 10 种 FFase 进行基因表达和发酵酶活力测定。经过初步筛选，发现 6 种菌株具有 FFase 活性，酶活力最高的菌株为 *S. troglodytae*（图 1）。

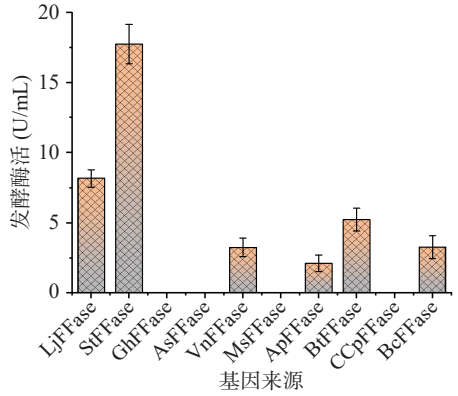


图 1　不同来源果糖基转移酶的发酵酶活力筛选

Fig.1　Screening of fermentation enzyme activity of fructosyltransferases from different sources

通过 MEGA 5.1 和 iTOL 分析 StFFase 及已报道的 13 种 FFase 之间的进化关系（图 2a），结果显示 StFFase 与 *Leuconostoc mesenteroides* 来源的 *β*-（2，6）果聚糖蔗糖酶（LS）关系密切。利用 Clustal Omega（https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo）网站对不同的 FFase 进行氨基酸序列和同一性分析，结果显示，StFFase 和其他来源的 FFase 相比具有较低的序列相似度（20.32%~39.38%）。然而，StFFase 具有和其他 LS 类似的结构区域：（Ⅰ）信号肽，该部分约有 40 个氨基酸；（Ⅱ）N-端可变区，该部分的氨基酸序列不保守；（Ⅲ）催化结构区，该部分构成了保守的催化口袋；（Ⅳ）C-端可变区，该部分的氨基酸序列也不保守（图 2b）[17−18]。

2.2　计算机辅助检测及突变体初筛

基于计算机筛选和结构分析合理选择突变“热点”氨基酸已普遍成为改进酶稳定性和催化功效的良好策略[19−21]。为了系统地识别潜在的突变热点，使用计算辅助工具 EVCoupling 进行结构导向预测（图 3a）。Web 服务器 EVCoupling 认为 ΔΔG>0 的突变是有利的，其中 15 个突变位点中 ΔΔG≥0.5 kcal·mol^{-1} 包含了 28 个潜在突变体。结合计算

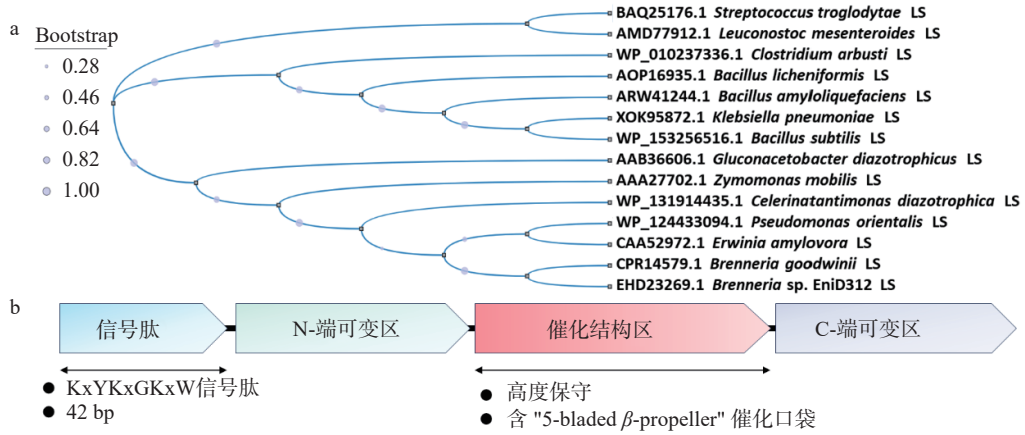


图 2　不同来源果糖基转移酶的进化关系和主要序列组成

Fig.2　Evolutionary relationship and main sequence composition of fructosyltransferases from different sources

注: a: 系统进化树; b: 果糖基转移酶的序列结构组成。

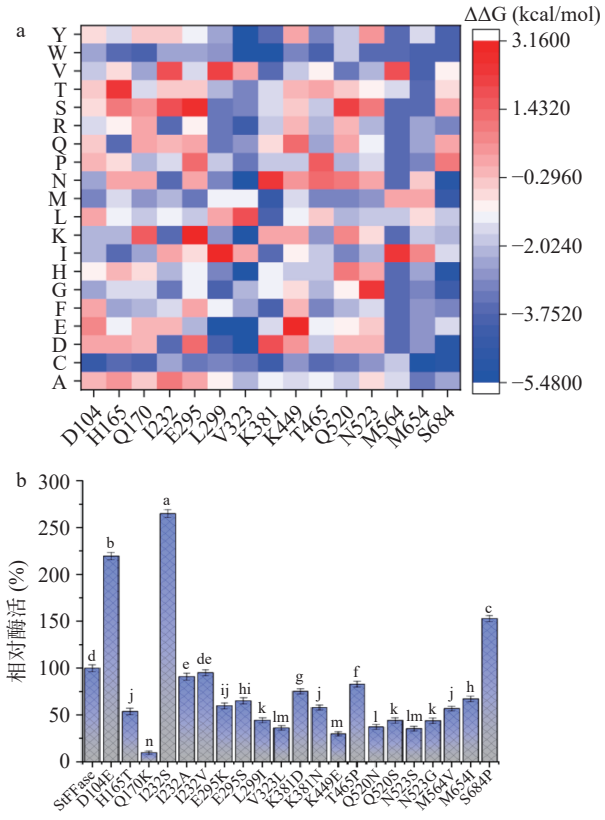


图 3　计算机辅助突变位点的选择及突变体初筛

Fig.3　Computer-assisted selection of mutation sites and primary screening of mutants

注: a: 突变热图; b: 突变体酶活测定; 不同字母表示同一指标间差异显著(P<0.05)。

机推荐的结果, 优先选取具有更高稳定性且排名靠前的突变位点作为筛选对象, 初步选定了 21 个潜在突变体, 分别为 D104E、H165T、Q170K、I232S、I232A、I232V、E295K、E295S、L299I、V323L、K381D、K381N、K449E、T465P、Q520N、Q520S、N523S、N523G、M564V、M654I 和 S684P。

将上述 21 个突变体进行重组菌株的构建。为了快速筛选突变位点, 测定突变菌株的全细胞酶活, 如图 3b 所示。经过初步筛选, 发现 D104E、I232S 和 S684P 突变体的酶活性显著增加(P<0.05), 分别提高到野生酶的 2.20、2.65 和 1.53 倍, 而其余突变体的酶活性均有不同程度的降低。

2.3　温度和热稳定性对酶活力的影响

系统研究了野生型 StFFase 及单点突变体在温度梯度(40~70 ℃)下的催化性能。如图 4a 所示, 野生型 StFFase 及突变体 D104E、I232S 和 S684P 在 50 ℃ 时显示出最佳活性。在 45~65 ℃ 范围内, StFFase 和突变体 D104E 及 S684P 的相对酶活超过 50%。特别地, 突变体 I232S 在整个 40~70 ℃ 的温度范围内保持超过 50% 的相对酶活。目前已报道的 FFase 最适温度范围较宽, 为 20~60 ℃。其中, 源自 *Bacillus* sp. TH4-2[11] 和 *R. aquatilis*[22] 的 FFase 最适温度最高(60 ℃), 而 *Z. mobilis* 来源的 FFase 最适温度最低(23 ℃)[8]。

热稳定性是影响酶工业适用性的重要因素。采用半衰期($t_{1/2}$)来表征重组酶和突变体的热稳定性。如图 4b、c 和 d 所示, 野生酶 StFFase 在 50、60 和 70 ℃ 下的 $t_{1/2}$ 值分别为 2.75、1.84 和 1.29 h。在 50 ℃ 下的热失活动力学分析揭示了突变体稳定性的显著差异。I232S 表现出卓越的稳定性($t_{1/2}$=6.60 h), 优于所有突变体。D104E($t_{1/2}$=3.61 h)及 S684P($t_{1/2}$=3.19 h)也表现出适度改善, 60 ℃ 和 70 ℃ 下, D104E 的半衰期和 S684P 接近, 且优于野生酶。突变体 I232S 表现出更强的热适应性: 与野生型相比, 其在 60 ℃ 和 70 ℃ 下的半衰期延长了 1.78 h 和 0.53 h。这些结果突显了残基特异性取代在调控热稳定性中的关键作用。

2.4　pH 和金属离子对酶活力的影响

进一步研究了 pH(5.0~9.0)对酶活性的影响(图 5a)。野生酶 StFFase 在 pH6.0 时活性最高, 偏离这个范围会导致酶活性显著降低。相比之下, S684P 的最适 pH 为 6.5, 而突变体 D104E 和 I232S 的最适 pH 和 StFFase 相同。在 pH5.0~7.0 的范围内, D104E、I232S 和 S684P 分别可以保持其在最

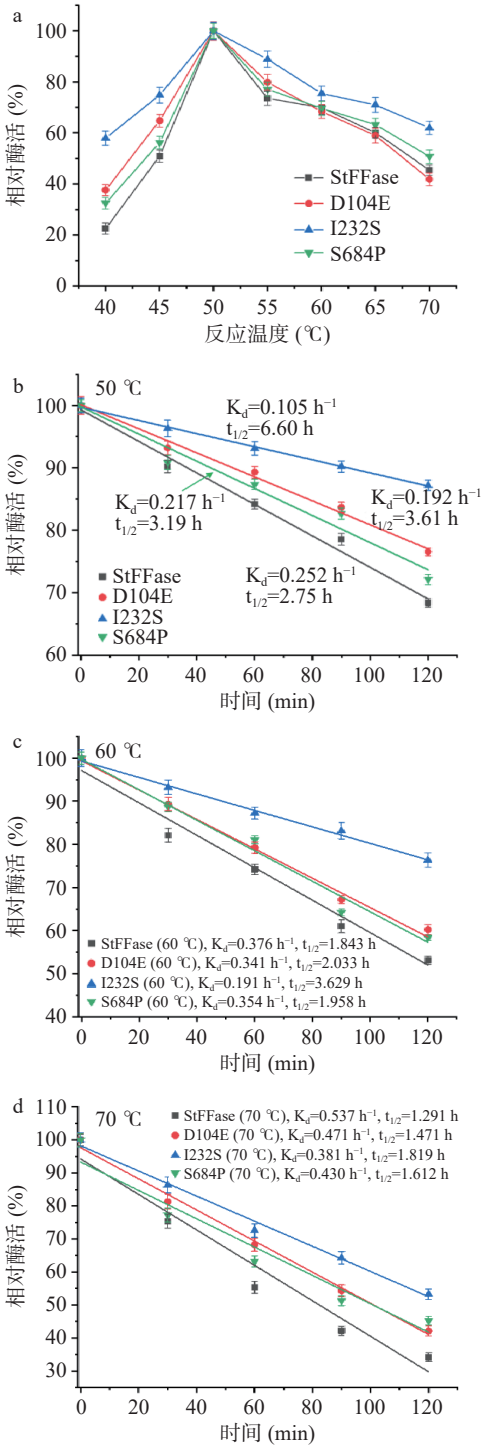


图 4　StFFase 及突变体的最适温度及温度稳定性

Fig.4　Optimal temperature and thermal stability of StFFase and the mutants

注：a：最适温度；b：温度稳定性（50 ℃）；c：温度稳定性（60 ℃）；d：温度稳定性（70 ℃）。

适 pH 下所具有的 50%、70% 和 60% 以上的酶活力。与大多数 FFase 一致，最适 pH 范围以中性和弱酸性为主（5.0~7.0）。源自 *Brenneria goodwinii* 和 *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508 的 FFase 均在 pH5.5 时表现出最高活性[23−24]。不同的是，*B. aryabhattai* GYC2-3 来源的 FFase 兼具碱性耐受性（在 pH8.0 活性最高）[13]。

金属离子与酶的结合不仅有助于稳定酶的空间

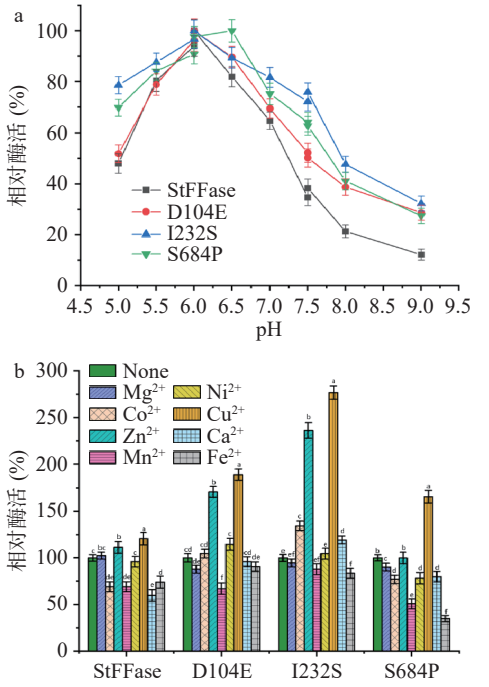


图 5　pH 及金属离子对 StFFase 及突变体的影响

Fig.5　Influence of pH and metal ions on StFFase and mutants

注：a：最适 pH；b：金属离子；不同字母表示同一指标间差异显著（P<0.05）。

构象，还能够作为酶与底物之间的连接桥梁，通过调整两者之间的相对位置促进反应进行[19]。不同金属离子对 StFFase 及其突变体催化活性的影响如图 5b 所示。在不添加金属离子的条件下，StFFase 及其突变体仍保持基础催化活性，而外源金属离子的引入则呈现出明显的差异化调控效应。对于野生型 StFFase，Co^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+}和 Fe^{2+}表现出强烈的抑制作用；Mg^{2+}和 Ni^{2+}的影响相对较小；而 Zn^{2+}与 Cu^{2+}则能有效增强其酶活。这种调控模式在突变体中发生了显著改变。Co^{2+}对 StFFase 和 S684P 具有抑制效应，但对 I232S 却呈现出独特的激活作用，推测 I232S 点突变通过将异亮氨酸替换为丝氨酸，可能微妙地改变了活性中心附近的微环境及金属离子配位场。Zn^{2+}对 StFFase 及 D104E 和 I232S 均表现出强烈的激活效应，其中对 I232S 的激活程度最高，相对酶活超过 230%，但对 S684P 的激活幅度则相对有限。Cu^{2+}则对所有测试酶均表现出普适的增强效果。已有研究指出，金属离子对 FFase 活性的调控呈现革兰氏属性依赖性：革兰氏阳性菌源 FFase 普遍受离子激活，如 Fe^{2+}使 *Bacillus* sp. TH4-2 活性提升 4 倍[11]，Ca^{2+}使 *L. reuteri* LTH5448 活性增强 135%[2]；而革兰氏阴性菌源 FFase（如 *Z. mobilis*）多表现为离子不敏感[8]。

2.5　动力学参数测定

野生型 StFFase 及突变体对底物蔗糖的动力学参数通过米氏方程拟合得到（表 2）。结果显示，StFFase 对蔗糖的 K_m 值为 221±9 mmol/L，而突变

体 D104E 和 S684P 的 K_m 值分别为 190±7 mmol/L 和 196±9 mmol/L，较野生型分别降低约 14.03% 和 11.31%，表明这两个突变体对底物的亲和力有所提高。特别地，突变体 I232S 对蔗糖的 K_m 值进一步降低至 171±11 mmol/L，显著提升了其与底物的亲和力，推测该突变可能通过优化底物结合口袋的构象增强了结合效率。在催化效率方面，三个突变体 D104E、I232S 和 S684P 均高于野生型 StFFase，其中 I232S 的 k_{cat}/K_m 值最高（16.70 mmol/L/s），较野生型提高了约 57%。同时，三个突变体的 k_{cat} 值均高于野生型，表明这些突变可能通过平衡底物结合与催化步骤之间的动力学瓶颈，进一步优化了酶的整体催化性能。

表 2 野生型 StFFase 及突变体的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the StFFase and mutants

酶名称	K_m(mmol/L)	k_{cat}(s^{-1})	k_{cat}/K_m(mmol/L/s)
StFFase	221±9^{a}	2348±17^{d}	10.62
D104E	190±7^{bc}	2457±19^{b}	12.93
I232S	171±11^{c}	2869±23^{a}	16.70
S684P	196±9^{b}	2399±14^{c}	12.24

注：不同字母表示同一指标间差异显著（$P<0.05$）。

2.6 结构模拟及突变位点分析

为了理解突变体催化活力及稳定性提高的分子机制，通过结构模拟和分子对接来分析 StFFase 突变前后的相互作用变化。StFFase 的单体结构模型由 SWISS-MODEL 服务器预测，使用 AlphaFold 2 数据库（P11701.1）为模板。模型通过拉氏构象图进行验证，显示超过 96.13% 的残基位于允许区域，仅少数 2% 的残基位于拉氏图的相对允许区域，表明模型质量良好且预测结构可靠（图 6）。

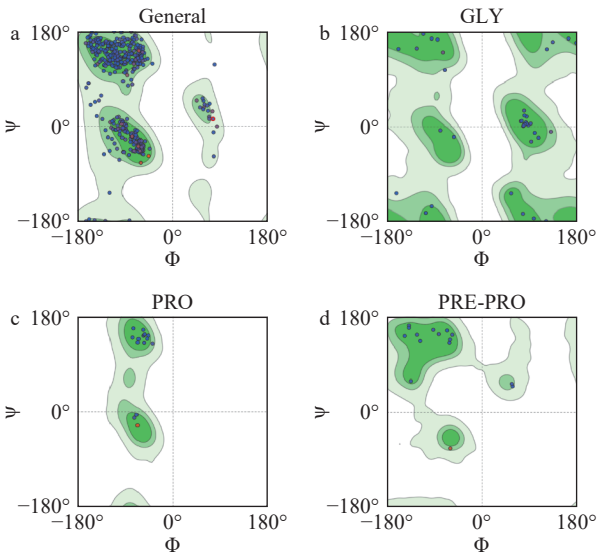


图 6 StFFase 结构模型的拉式构象图

Fig.6 Ramachandran plot of predicted protein structure of StFFase

注：a：蛋白总体拉氏图；b：甘氨酸拉氏图；c：脯氨酸二面角分布情况；d：脯氨酸前一个残基的二面角分布情况。

对 StFFase 与模板进行结构重叠，结果显示均方根偏差（RMSD）为 0.051，含有高度保守的 N 端催化结构域，该结构域包含 5 个折叠 β-螺旋桨（编号 1 到 5），β-螺旋桨呈现辐射状围绕着中心轴，形成一个漏斗状的中央空腔（图 7a）。通过分子对接进一步评估了酶分子与底物蔗糖的亲和力及结合模式。结果显示，配体可形成稳定的结合构象，并表现出−5.28 kcal/mol 的结合自由能。结合构象分析表明，蔗糖通过 Trp218、Met243、Asn252、Trp287、Ser288、Arg372、Asp373、Glu470、Glu472、Arg490、His493 和 Arg571 等残基形成密集的氢键网络，并与 Arg571形成强效盐桥，精准锚定于酶活性中心的疏水口袋（图 7b）。双重模式相互作用为酶催化效率的分子机制提供了结构基础。

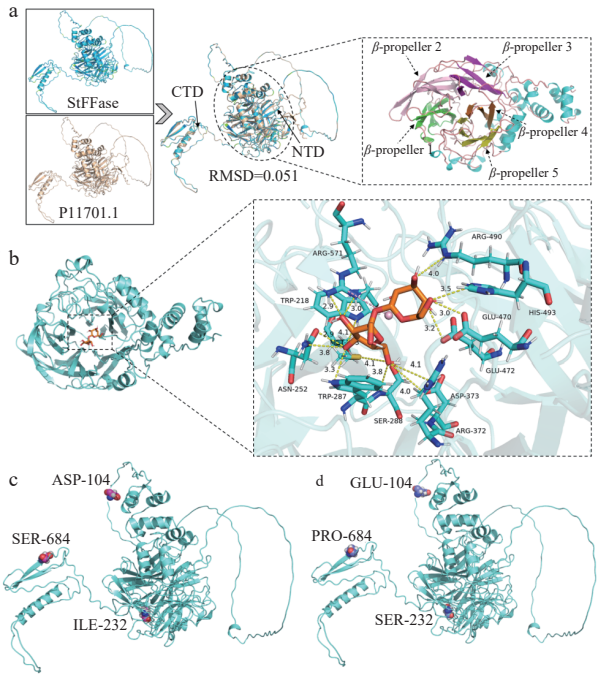


图 7 StFFase 的三维结构预测与分子对接

Fig.7 Three-dimensional structure prediction and molecular docking of StFFase

注：a：StFFase 与模板结构重叠；b：StFFase 与蔗糖的分子对接，蔗糖以橙色棍棒模型显示，蔗糖与周围有相互作用的残基用蓝色棍棒模型显示，氢键以黄色虚线显示，盐桥以粉色虚线显示；c：突变前位点示意图；d：突变后位点示意图。

突变体的三个关键位点（D104E、I232S 和 S684P）通过 Pymol 可视化。突变前后的残基位置分别用红色（图 7c）和蓝色（图 7d）的球状模型表示。通过对比突变前后的结构相互作用，进一步阐明突变体催化活力与热稳定性提升的分子机制。如图 8 所示，D104 本身带负电且侧链较长，而突变后的 E104 虽同为酸性氨基酸，但其侧链构象与电荷分布存在差异。负电荷环境的改变可能消除了原本存在的不利静电排斥，从而更有利于稳定带正电的过渡态中间体，提高催化效率。I232 位于蛋白质的疏水内部，其大的体积和疏水性可能会过度限制该区域的运动，而 S232 与周围的原子形成氢键，新氢键的形成显著

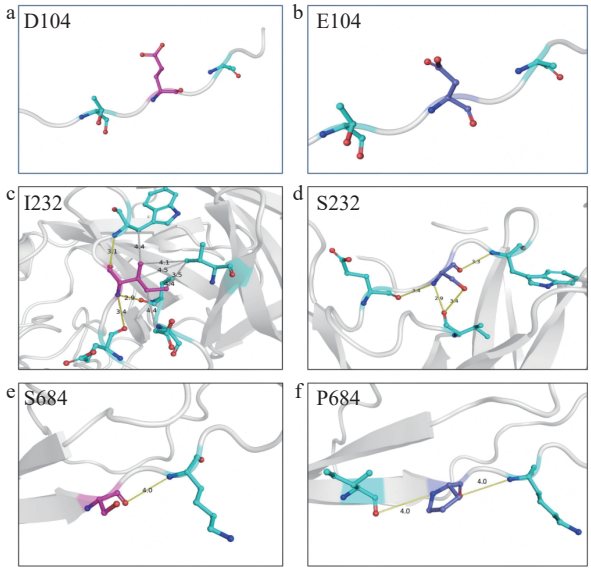


图 8　突变前后位点相互作用力变化

Fig.8　Changes in site interaction forces before and after mutation

注：a：突变前 D104 作用力变化；b：突变后 E104 作用力变化；c：突变前 I232 作用力变化；d：突变后 S232 作用力变化；e：突变前 S684 作用力变化；f：突变后 P684 作用力变化。野生型和突变型残基分别用红色和紫色棍棒模型显示，与周围有相互作用的残基用蓝色棍棒模型显示，氢键以黄色虚线显示，疏水相互作用以灰色虚线显示。

增加了局部区域的刚性，从而增强整体热稳定性[25]。S684 位于 *β*-转角的末端，脯氨酸的引入可能将其“锁定”为一个特定的、稳定的 *β*-转角构象，防止该环在高温下解折叠，从而稳定整体结构[26−27]。综上，突变体通过调控关键位点的氢键、静电相互作用，并协同刚性化与柔韧性的动态特性，实现了催化活力与热稳定性的提升。

2.7　蔗果三糖的生物合成

为评估突变体 I232S 在生物催化合成蔗果三糖方面的潜力，控制酶反应体系的加酶量为 15 U/g 蔗糖，并以质量分数 50% 的蔗糖为底物进行酶促转化。反应过程定时取样，利用 HPLC 监测反应进程。图 9 结果显示，蔗果三糖的转化率在 2 h 内迅速上升，并于 6 h 左右基本达到平衡，对底物蔗糖的转化率最高能够达到 42.17%。已报道的 *Celerinatantimonas diazotrophica* 来源的 FFase 催化蔗糖转化生成蔗果三糖的平衡转化率均在 30% 左右[16]，表明该酶有望成为工业化生产蔗果三糖的工具酶。

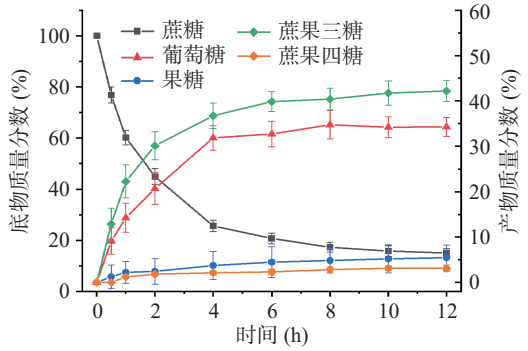


图 9　突变体 I232S 催化蔗糖生成蔗果三糖的转化过程

Fig.9　Time courses of enzymatic synthesis of 1-kestose from sucrose by the mutant I232S

3　结论

本研究通过基因挖掘技术获得了一种 *S. troglodytae* 来源的新型果糖基转移酶，其与 *β*-(2,6)-果聚糖蔗糖酶亲缘关系高，且具备典型的催化结构域。通过计算机辅助理性设计，筛选出三个催化效率显著提升的突变体：D104E、I232S 和 S684P，其酶活分别达野生型的 2.20、2.65 和 1.53 倍。其中，I232S 突变体表现出最优的综合性能：在 40~70 ℃ 范围内仍保持 50% 以上相对酶活，50 ℃ 下半衰期延长至 6.60 h；对蔗糖的 K_m 值降低至 171 mmol/L，底物亲和力和催化效率显著提高；在 50% 蔗糖浓度和 15 U/g 蔗糖加酶量条件下，蔗果三糖转化率高达 42.17%。结构模拟表明，D104E 通过消除静电排斥优化电性环境，I232S 通过形成新氢键增强局部刚性及热稳定性，S684P 则通过稳定 *β*-转角构象防止高温解折叠。本研究实现了 StFFase 催化效率与热稳定性的提升，为果糖基转移酶的理性设计提供了新策略，并显著推进其工业应用潜力。

© 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] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(5): 1119−1128.

[2] NI D W, XU W, BAI Y X, et al. Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 113(1): 29−37.

[3] FLORES A C, MORLETT J A, RODRÍGUEZ R. Inulin potential for enzymatic obtaining of prebiotic oligosaccharides[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(11): 1893−1902.

[4] RAWAT H K, SONI H, TREICHEL H, et al. Biotechnological potential of microbial inulinases: recent perspective[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(18): 3818−3829.

[5] MUTANDA T, MOKOENA M P, OLANIRAN A O, et al. Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(6): 893−906.

[6] OZIMEK L K, KRALJ S, KAPER T, et al. Single amino acid residue changes in subsite-1 of inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121 strongly influence the size of products synthesized[J]. FEBS Journal, 2006, 273(17): 4104−4113.

[7] GEIER G, GEIDER K. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fireblight pathogen *Erwinia-*

amylovora[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1993, 42(6): 387−404.

[8] HAN W C, BYUN S H, KIM M H, et al. Production of lactosucrose from sucrose and lactose by a levansucrase from *Zymomonas mobilis*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(10): 1153−1160.

[9] XU W, LIU Q, BAI Y X, et al. Physicochemical properties of a high molecular weight levan from *Brenneria* sp. EniD312[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 109(1): 810−818.

[10] GU Y, ZHENG J, FENG J, et al. Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(10): 4163−4174.

[11] BEN AMMAR Y, MATSUBARA T, ITO K, et al. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature[J]. Journal of Biotechnology, 2002, 99(2): 111−119.

[12] GUANG C, ZHANG X, NI D, et al. Identification of a thermostable levansucrase from *Pseudomonas orientalis* that allows unique product specificity at different temperatures[J]. Polymers (Basel), 2023, 15(6): 1435.

[13] NASIR A, SATTAR F, ASHFAQ I, et al. Production and characterization of a high molecular weight levan and fructooligosaccharides from a rhizospheric isolate of *Bacillus aryabhattai*[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 123: 109093.

[14] HERTADI R, UMRIANI P N, RATNANINGSIH E. Box-Wilson design for optimization of *in vitro* levan production and levan application as antioxidant and antibacterial agents[J]. Iranian Biomedical Journal, 2021, 25(3): 202−212.

[15] SALAMA B M, HELMY W A, RAGAB T I M, et al. Characterization of a new efficient low molecular weight *Bacillus subtilis* NRC_{16} levansucrase and its levan[J]. Journal of Basic Microbiology, 2019, 59(10): 1004−1015.

[16] 张晓琦, 徐炜, 倪大伟, 等. 具有极高热稳定性的 *β*-(2, 6)果聚糖蔗糖酶的挖掘、鉴定及应用[J]. 食品与生物技术学报, 2023, 42(4): 57−68. [ZHANG X Q, XU W, NI D W, et al. Characterization of an extreme thermostable levansucrase and its application[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(4): 57−68.]

[17] MENG G, FÜTTERER K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase[J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2003, 10(11): 935−941.

[18] HOMANN A, BIEDENDIECK R, GÖTZE S, et al. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 407(2): 189−198.

[19] LI M L, ZHANG T, LI C C, et al. Semi-rationally designed site-saturation mutation of *Helicobacter pylori* alpha-1,2-fucosyltransferase for improved catalytic activity and thermostability[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 259(2): 129316.

[20] JIA R, LI M, MIAO M, et al. Efficient *de novo* synthesis of 3-fucosyllactose in *Escherichia coli* via enzyme engineering and pathway refinement[J]. Bioresource Technology, 2025, 436: 132974.

[21] LI M L, JIA R Y, YAO J W, et al. Structure-guided iterative mutagenesis drives dual-functional evolution of *α*-1,3-fucosyltransferase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(37): 23523−23534.

[22] OHTSUKA K, HINO S, FUKUSHIMA T, et al. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JCM-1683[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2014, 56(9): 1373−1377.

[23] LIU Q, YU S H, ZHANG T, et al. Efficient biosynthesis of levan from sucrose by a novel levansucrase from *Brenneria goodwinii*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157: 1732−1740.

[24] JADAUN J S, NARNOLIYA L K, AGARWAL N, et al. Catalytic biosynthesis of levan and short-chain fructooligosaccharides from sucrose-containing feedstocks by employing the levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* MTCC10508[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 127(15): 486−495.

[25] ZHANG Y J, ZHANG T, LI M L, et al. Rational design to improve the catalytic efficiency and stability of arginine deiminase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269(1): 132083.

[26] 王文玉, 张涛. 理性设计提高奥氏嗜热盐丝菌精氨酸脱亚胺酶的热稳定性[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(4): 1−7. [WANG W Y, ZHANG T. Rational design to improve the thermostability of arginine deiminase from *Halothermothrix orenii*[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(4): 1−7.]

[27] XU W, ZHANG X Q, NI D W, et al. A review of fructosyltransferases from catalytic characteristics and structural features to reaction mechanisms and product specificity[J]. Food Chemistry, 2024, 440: 138250.