

## 研究报告

## 定向进化和半理性设计改造顺式环氧琥珀酸水解酶

王国桢<sup>1</sup>, 谢志鹏<sup>\*1,2</sup>, 张建国<sup>3</sup>

1 浙江大学药物生物技术研究所以及医学院, 浙江 杭州 310058

2 浙江省微生物生化与代谢工程重点实验室, 浙江 杭州 310058

3 杭州宝晶生物股份有限公司, 浙江 杭州 311106

王国桢, 谢志鹏, 张建国. 定向进化和半理性设计改造顺式环氧琥珀酸水解酶[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1741-1755.

WANG Guohui, XIE Zhipeng, ZHANG Jianguo. Modification of *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase by random mutation combined with semi-rational design[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 1741-1755.

**摘要:** 【背景】D(-)-酒石酸是非天然有机酸, 在保健品、食品和肿瘤药物合成等行业具有重大应用潜力, 目前主要通过生物转化法生产, 即顺式环氧琥珀酸水解酶[*cis*-epoxysuccinic acid hydrolase, CESH(D)]水解顺式环氧琥珀酸(*cis*-epoxysuccinic acid, ESH)生成 D(-)-酒石酸。该法简单温和, 但存在 CESH(D)酶活转化效率低下的瓶颈问题。【目的】通过基因工程改造, 提高 CESH(D)的酶活力、温度和 pH 稳定性。【方法】利用定向进化和半理性设计体外改造 CESH(D), 高通量筛选出正向突变体; 然后对其进行酶学性质研究, 包括比酶活、温度和 pH 对酶催化效率的影响、酶的温度稳定性、pH 稳定性及酶促动力学分析; 最后通过分子对接等手段分析突变位点影响催化活性的初步机制。【结果】筛选获得 4 个正向突变体 L231P/N226S、V77I、D183E 和 T223S。与野生型相比, 4 个突变体的比酶活分别提高 2.2、1.6、1.5 和 1.4 倍。其中, L231P/N226S 的温度稳定性和 pH 稳定性较野生型均有显著提高, 55 °C 时催化活性为野生型的 1.6 倍, pH 6.0 时催化活性为野生型的 1.2 倍。动力学分析发现, 突变体 L231P/N226S 和 T223S 对底物 ESH 的亲和力有明显提升,  $K_m$  值分别为 20 mmol/L 和 21 mmol/L, 较野生型分别降低 18% 和 16%。分子对接研究表明, 突变位点主要通过改变底物结合口袋促进酶与底物的相互作用, 从而影响酶活。【结论】获得了温度和 pH 稳定性好、催化活性明显提高的 CESH(D)突变体, 初步分析突变位点影响酶活的机制, 为进一步研究 CESH(D)的结构-功能关系及深入改造提供指导。

**关键词:** 顺式环氧琥珀酸水解酶; D(-)-酒石酸; 定向进化; 半理性设计

\*Corresponding author. E-mail: xzp@zju.edu.cn

Received: 2022-07-13; Accepted: 2022-09-10; Published online: 2022-11-04

## Modification of *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase by random mutation combined with semi-rational design

WANG Guohui<sup>1</sup>, XIE Zhipeng<sup>\*1,2</sup>, ZHANG Jianguo<sup>3</sup>

1 Institute of Pharmaceutical Biotechnology & School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 Zhejiang Provincial Key Laboratory for Microbial Biochemistry and Metabolic Engineering, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3 Hangzhou Bioking Biochemical Engineering Limited Company, Hangzhou 311106, Zhejiang, China

**Abstract:** [Background] D(–)-tartaric acid is a non-natural organic acid, which has great application potential in health care products, food, and tumor drug synthesis. At present, D(–)-tartaric acid is produced from *cis*-epoxysuccinic acid (ESH) hydrolyzed by *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase [CESH(D)] through biotransformation. This method is simple and mild but has bottleneck problems such as low enzyme conversion efficiency of CESH(D). [Objective] To improve the enzyme activity, temperature, and pH stability of CESH(D) through genetic engineering. [Methods] Directional evolution and semi-rational design were used to modify CESH(D) *in vitro* to screen out forward mutants with high throughput. Then the enzymatic properties were studied, including the enzyme activity, the influence of temperature and pH on the catalytic efficiency of the enzyme, the temperature and pH stability of the enzyme, and enzymatic kinetics analysis. Finally, the primary mechanism of mutation sites affecting catalytic activity was analyzed using molecular docking. [Results] Four positive mutants L231P/N226S, V77I, D183E, and T223S were screened out. The specific enzyme activity of the four mutants was increased by 2.2, 1.6, 1.5, and 1.4 folds of the wild-type enzyme, respectively. The temperature stability and pH stability of L231P/N226S mutant were significantly higher as compared with the wild-type CESH(D), and its catalytic activity was 1.6 folds at 55 °C, and 1.2 folds at pH 6.0 as compared with the wild-type enzyme, respectively. Kinetic analysis showed that the affinity of L231P/N226S mutant and T223S mutant to ESH substrates was significantly increased, with  $K_m$  values of 20 mmol/L and 21 mmol/L, respectively, which were 18% and 16% lower than that of the wild-type enzyme, respectively. Finally, the results of molecular docking showed that the mutated site promoted the interaction between enzyme and substrate mainly by changing the substrate binding pocket, thus affecting enzyme activity. [Conclusion] Through experiments, CESH(D) mutants with good temperature and pH stability and significantly improved catalytic activity were obtained. The mechanism of mutation site affecting enzyme activity is preliminarily analyzed in this research, which lays a foundation to study the relationship between the structure and function of CESH(D) and its further improvement.

**Keywords:** *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase; D(–)-tartaric acid; directed evolution; semi-rational design

D(-)-酒石酸在自然界中分布较少且含量较低, 无法通过提取法工业化生产<sup>[1]</sup>。其存在于植物的果实和马的羊蹄甲中, 可用作手性原料参与肿瘤活性天然产物 goniofufurone、新型速效流感药物巴洛沙韦、C2 位邻二胺<sup>[2-3]</sup>等的合成。D(-)-酒石酸的主流生产工艺为生物转化法<sup>[4]</sup>, 即利用顺式环氧琥珀酸水解酶 [*cis*-epoxysuccinic acid hydrolase, CESH(D)] 水解顺式环氧琥珀酸 (*cis*-epoxysuccinic acid, ESH) 获得。

顺式环氧琥珀酸水解酶属于环氧化物水解酶家族成员, 根据 CESH 不同的酶学性质, 可以将 ESH 立体特异性地水解为不同构型的酒石酸<sup>[5]</sup>。CESH(L) 能催化 ESH 生成 L(+)-酒石酸, 而 CESH(D) 则能催化 ESH 生成 D(-)-酒石酸。

Cui 等<sup>[6]</sup>通过对来自博德特氏菌 (*Bordetella* sp.) BK-52 的 CESH(D) 和来自浑浊红球菌 (*Rhodococcus opacus*) 的 CESH(L) 酶学性质分析发现, 同样以 ESH 为底物, 天然 CESH(D) 活力仅为 CESH(L) 的 12%, 半衰期远小于 CESH(L), 导致 D(-)-酒石酸的生产成本大幅高于 L(+)-酒石酸, 限制了 D(-)-酒石酸在医药化工领域的应用。因此, 对 CESH(D) 进行分子生物学改造提高酶活力、提升酶活稳定性、延长半衰期是 D(-)-酒石酸生物转化技术亟须解决的问题。

本研究采用定向进化<sup>[7]</sup>结合半理性设计<sup>[8-9]</sup>策略, 实施 CESH(D) 酶的体外分子改造, 通过调整反应体系中的  $Mn^{2+}$  浓度, 向 CESH(D) 中引入随机突变构建随机突变文库, 结合分子对接、计算机模拟突变等手段选取定点突变位点构建饱和突变文库, 筛选出温度和 pH 稳定性好、酶活力较高的顺式环氧琥珀酸水解酶, 以期为进一步提高该酶工业应用价值奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)、克隆宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、质粒 pET-28a(+) 均为本实验室保存; 重组质粒 pET-28a(+)-CESH(D) 由本实验室构建和保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA Polymerase、QuickCut™ Dpn I、dTTP 和 dCTP, 宝日医生物技术(北京)有限公司; Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 顺式环氧琥珀酸钠, 杭州宝晶生物股份有限公司; PCR 级氯化锰溶液, 北京天恩泽生物技术有限公司; 基因片段的合成与测序由杭州擎科公司完成。

微孔板恒温振荡器, 杭州奥盛仪器有限公司; QPix 微生物筛选系统, 美谷分子仪器(上海)有限公司; 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 台式高速离心机, 艾本德有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波海曙科生超声设备有限公司。

### 1.2 突变酶的定向进化

#### 1.2.1 易错 PCR 的引物设计及扩增

以实验室保存的源自 *Bordetella* sp. BK-52 的 CESH(D) 作为易错 PCR 模板, GenBank 登录号为 EU053208。设计上游引物 ER-PCR-F (5'-GGAATTCCATATGATGACTCGAACCAAGT TG-3') 和下游引物 ER-PCR-R (5'-CCGGATCCT TAGTTGCTAATACCCAGAATTT-3')。易错 PCR 反应体系 (50  $\mu$ L):  $MgCl_2$  (25 mmol/L) 10  $\mu$ L, dTTP/dCTP (25 mmol/L) 2  $\mu$ L, 10 $\times$ Taq buffer 5  $\mu$ L, 质粒 pET-28a(+)-CESH(D) 模板 1  $\mu$ L, 引物 ER-PCR-F 和 ER-PCR-R (10 mmol/L) 各 1  $\mu$ L, dNTP Mix (2.5 mmol/L) 8  $\mu$ L, Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, 在体系中加入  $Mn^{2+}$  使浓度依

次达到 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保温。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳后切胶回收, 用于后续实验, 并进一步通过测序确定突变率。

### 1.2.2 随机突变文库的构建

相较于酶切连接法, 通过全片段质粒扩增法 (megaprimer PCR of whole plasmid, MEGAWHOP)<sup>[10]</sup> 来构建随机突变文库, 实验操作方便且目的基因空载率低, 极大地提高了文库效率。在反应体系中改变引物和模板量的比例 (5:1、3:1、20:1、15:1、10:1), 摸索反应条件, 确保全质粒的顺利扩增。

MEGAWHOP 反应体系 (50  $\mu$ L): 质粒 pET-28a(+)-CESH(D) 模板 (50 ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 易错 CESH(D) 基因片段 (megaprimer) (50 ng/ $\mu$ L) 分别加入 2.5、1.5、10、7.5 和 5.0  $\mu$ L, dNTP Mix (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 2 $\times$ DNA polymerase buffer 25  $\mu$ L, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 68  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 4 min 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保温。

PCR 产物经纯化回收后, 加入 1  $\mu$ L QuickCut Dpn I, PCR 仪控温 37  $^{\circ}$ C 下酶切消化模板质粒 3 h。酶切产物通过热激法直接转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞<sup>[11]</sup>。

### 1.2.3 随机突变体的诱导表达及高通量筛选

挑取突变文库中的阳性克隆及 5 个野生型克隆作为对照, 接入装有 LB 液体培养基 (含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素) 的 96 孔细胞培养板 (板 1, 装液量 300  $\mu$ L/孔) 中, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培

养 13 h 左右。取 50  $\mu$ L 板 1 中的菌液加入装有 LB 培养基 (含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素, 2% 乳糖, 0.25 mol/L 顺式环氧琥珀酸氢钠) 的 96 孔细胞培养板 (板 2, 装液量 600  $\mu$ L/孔) 中, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养 10 h 左右。

高通量筛选采用偏钒酸铵显色法<sup>[12]</sup>。将板 2 以 4 000 r/min 离心 10 min 后吸取各孔的 5  $\mu$ L 上清液于酶标板中, 使之与 25  $\mu$ L 1% 偏钒酸铵纯溶液和 10  $\mu$ L 1 mol/L 硫酸进行显色反应, 加入蒸馏水至总体积 250  $\mu$ L。检测显色液 OD<sub>480</sub> 的数值。

## 1.3 突变酶的半理性设计

### 1.3.1 酶与配体分子对接

LeDock 是一个免费的分子对接开源软件, 操作简单, 对接速度快<sup>[13]</sup>。通过 LeDock 软件将配体 ESH (PubChem CID: 2734802) 与去质子化的 CESH(D) (PDB ID: 5ZUM) 进行半柔性对接, 使用 UCSF Chimera<sup>[14]</sup> 和 WinCoot<sup>[15]</sup> 对选取的最适对接模型进行观察分析, 统计与配体距离 5  $\text{\AA}$  以内的 CESH(D) 中所有氨基酸位点。

### 1.3.2 计算机模拟突变及拟突变氨基酸的选择

对 Strum<sup>[16]</sup> 和 PoPMuSiC<sup>[17]</sup> 计算的 CESH(D) 各位点解折叠自由能变化 ( $\Delta\Delta G$ ) 结果进行统计, 筛选突变后解折叠自由能 ( $\Delta G$ ) 下降显著的位点。在 GenBank 数据库中通过 BLAST 寻找筛选 CESH(D) 的高一致性蛋白, ClustalW 软件对这些蛋白进行多序列同源比对分析<sup>[18]</sup>, 发现氨基酸的保守性。

### 1.3.3 定点饱和突变文库的构建和筛选

以重组质粒 pET-28a(+)-CESH(D) 作为模板, 在选择的突变位点处利用 NNK/MNN 密码子设计引物, 进行全质粒的定点饱和突变<sup>[19]</sup>, 构建定点饱和突变文库, 文库的诱导表达和高通量筛选同 1.2.3。

## 1.4 组合突变的设计

根据随机突变文库和定点饱和突变文库的筛选结果, 获得一些酶活提高较大的正向突变体, 将其突变位点进行排列组合, 利用全质粒 PCR 法<sup>[20]</sup>构建组合突变体, 以达到叠加突变优势的目的。

## 1.5 突变酶学性质的研究

### 1.5.1 突变酶的表达与纯化

将野生型(wild type, WT)和优势突变菌接种到 LB 培养基(含 50  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素)中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.4–0.6, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 8 h, 诱导重组蛋白表达。4  $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 经冰浴超声破碎, 破碎功率 600 W, 超声 3 s, 停歇 3 s, 全程工作时间 9 min。4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min 收集上清液, 即为粗酶液。上清液经 Ni-agarose 得到纯化目的蛋白, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)确定目的蛋白 CESH(D)的分子量和蛋白纯度, 利用考马斯亮蓝法(Bradford 法)<sup>[21]</sup>测定 CESH(D)的蛋白浓度。

### 1.5.2 突变酶的酶活测定及动力学分析

采用 CESH(D)水解底物顺式环氧琥珀酸钠产生 D(-)-酒石酸的速度来定义酶活, 通过偏钒酸铵显色法测定酒石酸含量<sup>[12]</sup>。水解酶的酶活力单位定义为每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  酒石酸所需的酶量<sup>[22]</sup>。每毫克蛋白的酶活单位定义为比酶活。

分别测定 WT 和各优势突变酶的动力学参数, 在不同浓度顺式环氧琥珀酸钠底物溶液中加入适量酶液, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 条件下振荡反应 8 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 测定上清液在 480 nm 处的吸光度值( $OD_{480}$ ), 采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法得

到  $K_m$  和  $k_{cat}$  值<sup>[23]</sup>。底物浓度分别为 10、15、35、50、70、90、110、130 和 150 mmol/L, 每个浓度设置 3 组平行。

### 1.5.3 最适温度和温度稳定性

取适量纯酶液, 在 pH 7.5 的条件下分别于 4、25、30、37、40、45、50、55、60 和 70  $^{\circ}\text{C}$  反应测定酶活, 以最高的酶活力定义为 100%, 所有数据设置 3 组平行, 考察反应温度对 WT 和优势突变体的影响。

取适量纯酶液, 分别于上述不同温度下孵育 60 min, 然后在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 的条件下测定酶活, 分析酶的温度稳定性。

### 1.5.4 最适 pH 和 pH 稳定性

取适量纯酶液, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下分别于 pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 和 9.5 反应测定酶活, 考察反应 pH 对 WT 和优势突变体的影响。

取适量纯酶液, 分别于上述不同 pH 条件下孵育 60 min, 然后在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.5 的条件下反应测定酶活, 确定酶的 pH 稳定性。

## 1.6 突变酶蛋白的三级结构模拟与分析

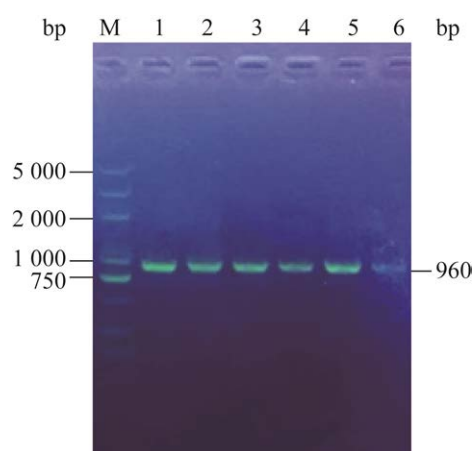
通过 Chimera 和 WinCoot 软件比较 WT 和正向突变酶的空间结构变化, 推测分析 CESH(D)酶学性质的变化与蛋白分子结构改变的联系。

## 2 结果与分析

### 2.1 随机突变文库的构建结果

#### 2.1.1 易错 PCR 条件的探究

易错 PCR 实验通过调整体系中  $\text{Mn}^{2+}$  浓度来构建合适突变频率且无序列倾向性的随机突变库<sup>[24]</sup>。结果如图 1 所示, 不同浓度的  $\text{Mn}^{2+}$  都能有效扩增 CESH(D)基因。然而  $\text{Mn}^{2+}$  的浓度过高或过低都会导致产生的突变数不符合随机突变文库规定的范围, 达不到构库的要求。

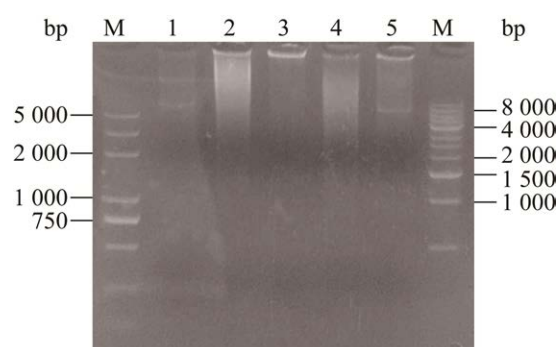


**图 1 不同  $Mn^{2+}$  浓度下易错 PCR 电泳图** M: DNA Marker; 1-6: 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mmol/L of  $Mn^{2+}$   
Figure 1 Electrophoresis of error-prone PCR at different  $Mn^{2+}$  concentrations. M: DNA Marker; 1-6: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L of  $Mn^{2+}$ .

较为合适的突变率为 CESH(D)氨基酸序列中有 1-5 个氨基酸发生突变, 依据这个原则, 对不同浓度  $Mn^{2+}$  的 PCR 产物测序, 根据测序结果选择  $Mn^{2+}$  浓度 0.5 mmol/L, 可以在 CESH(D)基因序列上产生 1-3 个氨基酸突变。

### 2.1.2 随机突变文库的建立

MEGAWHOP 构建的重组质粒 pET-28a(+)-CESH(D)长度约为 6.25 kb。图 2 结果显示, 当引物和模板的质量比为 10:1 和 5:1 时, 均出现



**图 2 不同比例的引物和模板量的 MEGAWHOP 电泳图** M: DNA Marker; 1-5: 引物和模板量之比为 5:1、3:1、20:1、15:1、10:1

Figure 2 MEGAWHOP electrophoresis with different proportions of primers and templates. M: DNA Marker; 1-5: Ratio of primer to template quantity were 5:1, 3:1, 20:1, 15:1, 10:1.

目的条带, 而 10:1 条件下的目的条带更为清晰明亮。因此, 选择该条件作为扩增的条件。

将 MEGAWHOP 产物经 *Dpn* I 消化后直接转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于抗性平板上, 获得随机突变文库, 库容达  $1 \times 10^5$ 。

### 2.2 随机突变文库的筛选结果分析

采用设计的筛选方法, 对构建的 CESH(D)随机突变文库初步筛选 55 块 96 孔板, 总计约 5 500 个突变体, 得到 24 个正向突变体。酶活筛选的 heatmap 如图 3 所示(图中数值为  $A_{480}$  的

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.825	0.854	0.802	0.784	0.191	1.052	0.905	1.028	0.713	0.952	0.799	0.864
B	0.293	0.190	0.196	1.105	1.029	0.938	1.002	1.028	1.016	1.009	1.008	0.306
C	0.887	0.898	0.789	0.998	0.862	0.981	0.902	1.080	1.049	1.086	0.809	0.319
D	0.856	0.847	0.771	0.215	0.833	1.097	0.999	0.737	0.815	0.957	0.963	1.011
E	1.281	0.817	1.057	0.715	0.899	1.011	0.204	0.425	1.079	0.997	1.225	1.003
F	0.230	0.819	0.729	1.004	0.983	0.673	0.978	0.654	1.011	1.011	0.982	0.940
G	1.081	0.923	0.965	0.714	0.182	0.187	1.021	0.185	0.685	1.024	0.385	0.180
H	0.577	1.352	0.898	0.994	1.070	0.603	0.775	0.793	0.990	0.945	0.896	0.892

**图 3 96 孔板酶活筛选的 heatmap**

Figure 3 Heatmap of enzyme activity screening in 96-well plates.



吸光值, A8、B9、C10、D11 和 E12 为野生型菌, E1 和 H2 为吸光值明显提高的菌种, 即酶催化效率可能有所提高的正向突变体)。

对初筛结果进行复筛, 突变体通过 25 mL 摇瓶培养后收集湿细胞, 与底物及脱氧胆酸钠共同反应, 比较全细胞酶活。选择复筛结果中酶活仍有提高的突变体进行 DNA 测序。结果如表 1 所示。根据测序结果, 排除无义突变后, 突变体中包含 1–2 个有效的碱基突变, 且突变类型包含转换和颠换, 说明前期构建的随机突变文库有效且文库质量较好。

## 2.3 拟突变氨基酸位点的选择

### 2.3.1 多序列同源比对

用 BLAST 软件在 PDB 蛋白数据库中寻找到 7 种与 CESH(D)酶具有同源性的蛋白<sup>[25]</sup>, 分别为 3NO5、2Y7D、3C6C、3CHV、3E02、3FA5 和 3LOT。用 ClustalW 软件进行比对分析, 发现一些氨基酸是完全保守的, 如 P22、H47、H49 和 N140 等; 一些氨基酸是高度保守的, 如 E40、Q52、D110 和 S118 等。这些位点可能对 CESH(D)酶的催化功能有重要意义, 往往是催化反应的必需氨基酸, 突变容易造成酶活丧失, 在后续选择饱和突变位点时会避开。

表 1 随机突变正向突变体催化活性及测序鉴定结果

Table 1 Catalytic activity and sequencing results of random mutation forward mutants

Mutation site	Mutated base	Mutated amino acid	Catalytic relative activity (%)
77	GTT→ATT	V77I	160.0
223	ACC→TCC	T223S	137.5
226	AAC→AGC	N226S	145.0
231	CTA→CCA	L231A	135.0

以 WT 的催化活性为 100%: 在 37 °C、pH 7.5 条件下 WT 的比酶活为 30 U/mg

The catalytic activity of WT was set at 100%: Specific enzyme activity of WT at 37 °C, pH 7.5 was 30 U/mg.

### 2.3.2 酶与配体分子对接

将配体 ESH 和去质子化的 CESH(D)进行分子对接, 结果如图 4A 所示。酶底物结合通道上的氨基酸变化可直接影响催化口袋, 对底物和产物的进出以及其精确构象造成影响<sup>[26]</sup>, 因此选取 CESH(D)酶中距配体 5 Å 以内的若干氨基酸位点 R11、E14、H47、H49、T82、L83、P113、D115、Y138、I162、W164、L188、E190、C225 和 K227, 排除保守性氨基酸后, 确定 L83、I162、L188 和 C225 作为定点饱和突变位点, 如图 4B 所示。

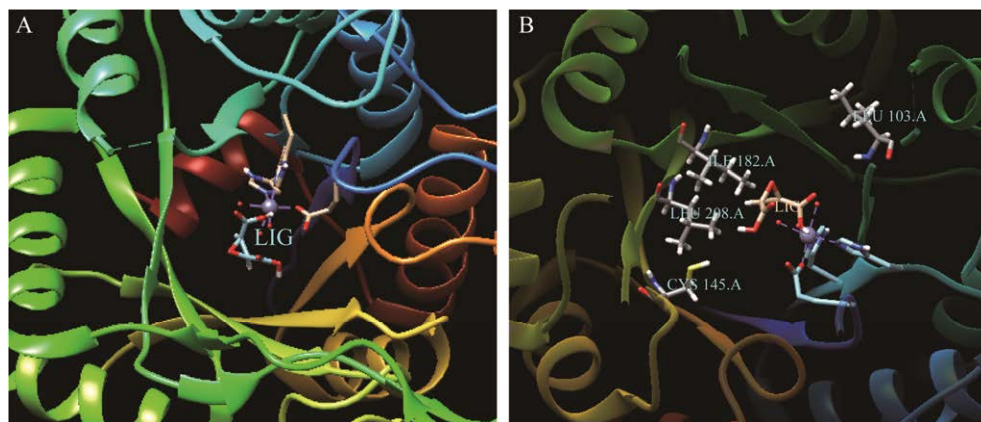


图 4 顺式环氧琥珀酸与 CESH(D)的分子对接(A)及底物结合口袋非保守氨基酸(B)示意图

Figure 4 Schematic diagram of CESH(D) molecular docking (A) and substrate binding pocket non-conserved amino acids (B).

### 2.3.3 计算机模拟突变

蛋白质的解折叠自由能  $\Delta G$  是蛋白质稳定性的重要参数<sup>[27-28]</sup>。若突变后的  $\Delta G$  较野生型下降,则表明该突变有利于提高蛋白质的稳定性;若突变后  $\Delta G$  增加,则说明该突变不利于蛋白质的稳定。

Strum 和 PoPMuSiC 的计算机模拟预测结果如表 2 所示。其中 E9、N262 和 P22 为保守性氨基酸,Dong 等<sup>[29]</sup>针对 CESH(D)酶催化机制的研究表明,D115、E190、R11 和 E9 是与催化机制有关的重要氨基酸。排除上述氨基酸位点后,确定 G32、E128、D183、D193 和 L231 作为定点饱和和突变位点。

### 2.4 定点饱和和突变文库的筛选

根据定向进化结果和分子对接以及计算机模拟突变的结果,选择 G32、V77、L83、E128、I162、D183、L188、D193、C225、T223、N226 和 L231 的 12 个位点进行饱和突变。表 3 展示了定点饱和和文库的正向筛选结果,突变位点 L188、D183 和 L231 都获得了新的正向突变结

表 2 拟突变氨基酸的选取

Table 2 Selection of pseudo-mutant amino acids

Tool	Site	Amino acid	Rosetta value
Strum	9	E	-6.01
	183	D	-3.32
	190	E	-3.2
	193	D	-4.39
	231	L	-4.31
	262	N	-5.68
PoPMuSiC	22	P	-2.1
	32	G	-5.7
	115	D	-5.6
	128	E	-4.5
	183	D	-3.1
	285	E	-3.3

Rosetta 值为折叠自由能  $\Delta G$  (kcal/mol)变化

Rosetta value is the change of folding free energy  $\Delta G$  (kcal/mol).

表 3 定点饱和正向突变体催化活性及测序鉴定结果

Table 3 Catalytic activity and sequencing results of site-specific saturated dominant mutants

Mutation site	Mutated base	Mutated amino acid	Catalytic relative activity (%)
77	GTT→ATT	V77I	160.0
183	GAC→GAG	D183E	148.0
183	GAC→GGG	D183G	125.0
188	CTG→ATG	L188M	124.0
223	ACC→TCC	T223S	137.5
226	AAC→AGC	N226S	145.0
231	CTA→CCA	L231P	156.0
231	CTA→GCG	L231A	135.0

果,选取酶活提高最为显著的突变类型进行后续实验;并且实验发现 L83 的任何突变均会导致酶活性丧失,表明 L83 对 CESH(D)酶的催化活性具有重要意义。

### 2.5 组合突变设计的结果

为了进一步提高顺式环氧琥珀酸水解酶 CESH(D)的催化活力,选取酶活较野生型 CESH(D)有明显提高的突变位点 V77I、D183E、L231P 和 N226S 进行组合。突变位点组合的筛选结果(表 4)发现,L231P 和 N226S 两个位点组合时酶活提高最为显著,为 WT 的 2.2 倍;而 V77I、D183E 与其他位点组合时酶活提升效果均不理想,未体现出叠加催化优势的目的,可能是由于组合突变体并不是严格意义上单突变体效应的叠加且突变体与突变体之间也存在一定的拮抗效应<sup>[30]</sup>,因此未继续设计 3 点突变的组合体。

### 2.6 突变酶学性质的研究结果

#### 2.6.1 酶的表达与纯化结果

根据 1.5.1 方法进行 WT 和突变体 L231P/N226S、V77I、D183E 和 T223S 的诱导表达,收集菌体进行超声破碎后取上清液,通过 SDS-PAGE 确定目的蛋白 CESH(D)的分子量及



表 4 组合突变体的催化活性

Table 4 Catalytic activity of the combined mutants

Mutation site	Mutated amino acid	Catalytic relative activity (%)
231/226	L231P/N226S	223
231/226/77	L231P/N226S/V77I	162
77/231	V77I/L231P	152
77/226	V77I/N226S	150
77/183	V77I/D183E	138
183/226	D183E/N226S	135
183/231	D183E/L231P	155

蛋白纯度(图 5A)。CESH(D)在大肠杆菌中可溶性表达, 基本存在于上清液中, 蛋白大小约 32 kDa, 各突变体的表达量与 WT 基本一致。

粗酶液通过 Ni-agarose 纯化后, CESH(D)均在 32 kDa 处呈现单一条带, 纯度达到 95%以上可用于后续酶学分析(图 5B)。

## 2.6.2 酶学特性分析结果

表 5 展示了 WT 和各突变体的比酶活检测结果, 所有突变体对 ESH 的催化活性均高于 WT, 且 L231P/N226S 的催化活性较 WT 提高 2 倍以上。

动力学参数测定(表 5)结果显示, 突变体 L231P/N226S 和 T223S 对底物的亲和力有明显提升,  $K_m$  值相比 WT 分别降低了 18%和 16%; 同时突变体 L231P/N226S、V77I、D183E 和 T223S 的  $k_{cat}/K_m$  值分别是 WT 的 1.9、1.4、1.3 和 1.3 倍。

## 2.6.3 温度对 CESH(D)突变体酶活的影响

反应温度对 CESH(D)酶活影响的研究(图 6A)表明, 突变体 D183E 的最适温度约 43 °C, 较 WT 的 40 °C稍有提高, 50 °C时 D183E 的酶活为 WT 的 1.2 倍, 而其他突变体的最适温度及在不同反应温度中的酶活与 WT 无显著差别。

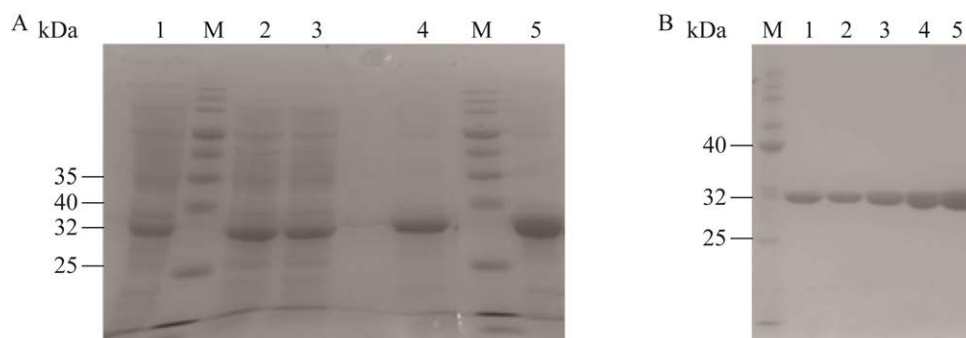


图 5 野生型 CESH(D)及其突变体的粗酶液(A)和纯化蛋白(B)的 SDS-PAGE 结果 M: 蛋白非预染 Marker; 1-5: 突变体 L231P/N226S、V77I、WT、D183E 和 T223S

Figure 5 SDS-PAGE results of crude enzyme solution (A) and purified protein (B) of WT and its mutants. M: Protein non-pre-staining Marker; 1-5: Mutants L231P/N226S, V77I, WT, D183E and T223S.

表 5 野生型 CESH(D)和各突变体的比酶活及动力学参数

Table 5 Specific enzyme activity and kinetic parameters of WT and each mutant

Mutant	Mutation site	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ (mmol/(L·s))	Specific activity (U/mg)
WT		24.5±0.30	18.40±1.23	0.75±0.05	30.20±1.68
L231P/N226S	231/226	20.0±0.20	27.80±2.06	1.39±0.10	67.35±2.50
V77I	77	25.0±0.25	26.12±2.54	1.05±0.11	48.32±1.55
D183E	183	25.7±0.15	23.50±1.38	0.95±0.18	43.70±1.17
T223S	223	20.6±0.21	20.12±1.15	0.97±0.06	41.52±2.03

温度稳定性的研究结果如图 6B 所示。所有酶在高于 50 °C 孵育 1 h 后,酶活出现显著下降,但突变体 L231P/N226S 和 D183E 的热稳定性均有所提升,55 °C 时的剩余酶活分别为 WT 的 1.7 倍和 1.5 倍。

#### 2.6.4 pH 对 CESH(D) 突变体酶活的影响

pH 条件研究(图 7A)表明,突变体 V77I、D183E 和 T223S 的最适反应 pH 与 WT 相似,均为 6.5。突变体 L231P/N226S 的最适 pH 有所降低,约为 6.2,且 pH 6.0 时的剩余酶活为 WT 的 1.2 倍,显示了一定程度的耐酸性能。

取适量突变体 L231P/N226S 纯酶液分别于 pH 6.0、6.1、6.2、6.3、6.5 反应测定酶活,结果(图 8)显示突变体 L231P/N226S 的最适反应 pH 值为 6.2。

pH 稳定性研究结果见图 7B,突变体 L231P/N226S 对酸性环境耐受力略强于其他突变体和 WT, pH 4.0 的剩余酶活是 WT 的 1.2 倍。各突变体的 pH 稳定性和 WT 相似,虽然突变体 V77I 和 T223S 的稳定性相较于 WT 略有下降,但在 pH 5.0–9.0 范围内均有良好的稳定性。

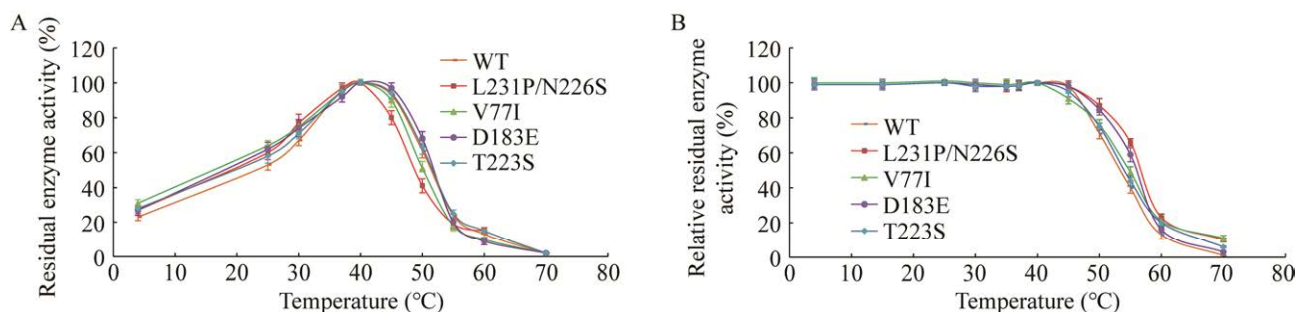


图 6 温度对野生型 CESH(D)及突变体催化活力及稳定性的影响 A: 反应温度对酶活的影响. B: 温度对酶稳定性的影响

Figure 6 Effects of temperature on catalytic activity and stability of WT and mutants. A: The effect of reaction temperature on enzyme activity. B: Effect of temperature on enzyme stability.

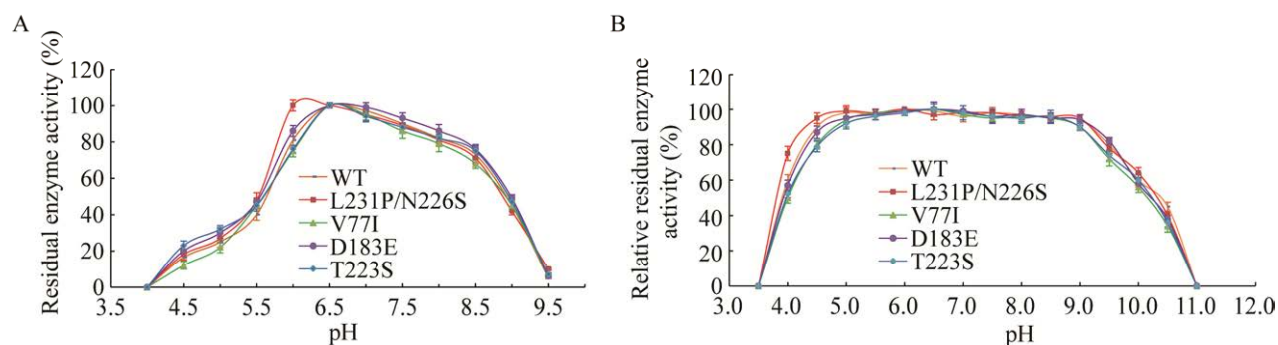
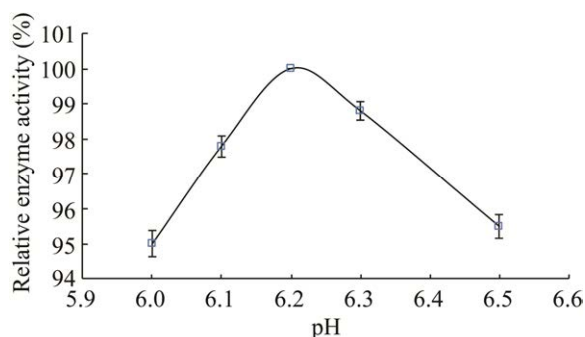


图 7 pH 对野生型 CESH(D)及突变体催化活力及稳定性的影响 A: 反应 pH 对酶活的影响. B: pH 对酶稳定性的影响

Figure 7 Effect of pH on catalytic activity and stability of WT and mutants. A: The effect of pH on enzyme activity. B: Influence of pH on enzyme stability.



**图 8 pH 对突变体 L231P/N226S 催化活力的影响**  
Figure 8 Effect of pH on catalytic activity of mutant L231P/N226S.

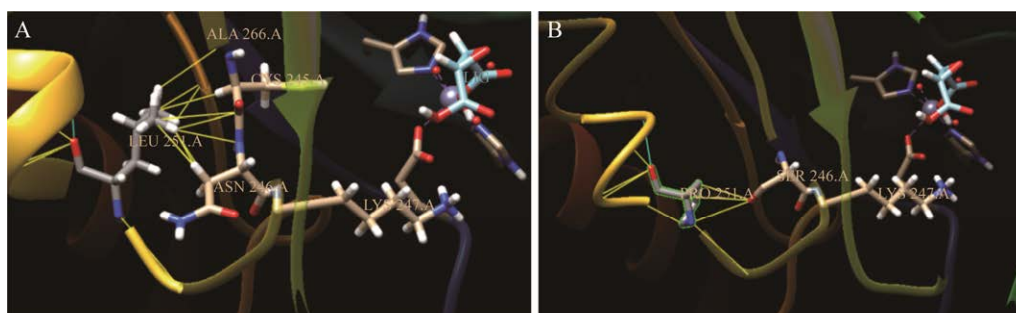
## 2.7 突变酶蛋白的三维结构模拟与分析

利用 Chimera 软件观察各突变位点在 CESH(D)中空间分布位置,发现 L83 位点距离酶活性中心较近, V77、T223、N226 和 L231 位点在底物结合口袋附近,而 D183 位点距离催化活性中心较远。

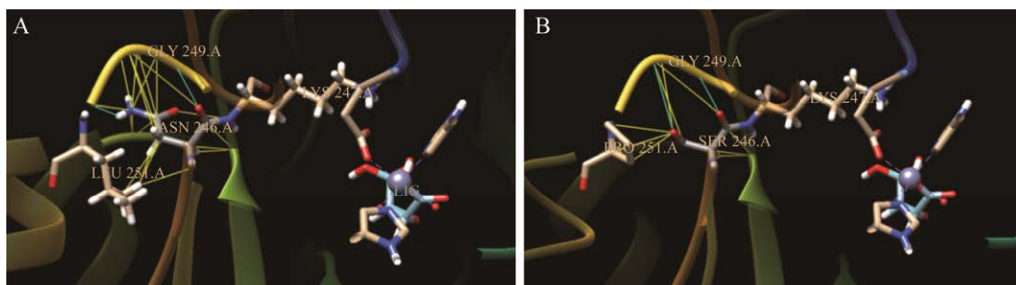
### 2.7.1 L231P/N226S 结构分析

观察 231 位点突变前后的结构(图 9)发现,位点上的 Leu 突变为 Pro,而 Pro 由于自身的吡咯烷环结构而具有较小的空间构象自由度,导致该位点的空间位阻大大降低<sup>[31]</sup>,并且突变后 231 位点与底物结合口袋处的 C225 的相互作用力减弱。图 10 展示了 226 位点突变前后的结构变化,226 位点由 Asn 突变为 Ser 后侧链基团上的羟基位点变为醛基,而且失去一个氨基位点,导致与 K227 的相互作用力消失。

两个位点的突变减弱了与底物结合口袋处的 C225 及 K227 的作用力,释放了重要催化残基<sup>[29]</sup>,柔性增加,并且 231 位点的突变使得底物通道侧方的空间位阻大大降低,拓宽底物通道,有助于底物进入口袋深处,使得酶与底物更好地结合<sup>[32]</sup>,促进酶催化活性的提高。



**图 9 231 位点与周围氨基酸的相互作用示意图** A: 野生型 CESH(D). B: 突变体 L231P  
Figure 9 Interaction of site 231 with surrounding amino acids. A: Wild-type CESH(D). B: Mutant L231P.



**图 10 226 位点与周围氨基酸的相互作用示意图** A: 野生型 CESH(D). B: 突变体 N226S  
Figure 10 Interaction of site 226 with surrounding amino acids. A: Wild-type CESH(D). B: Mutant N226S.

### 2.7.2 T223S 结构分析

通过对比 223 位点突变前后的结构(图 11)发现, 223 位点由 Thr 突变为 Ser 后, 侧链基团缩小, 与 245V 以及底物结合口袋处的残基 L188<sup>[33]</sup>之间的相互作用减弱。

223 位点位于底物结合口袋附近的, 释放了底物结合通道上的 L188, 柔性增加, 并且 231 位点的突变使得底物通道后方的空间位阻降低, 使得底物与活性中心结合得更加充分<sup>[32]</sup>, 从而使酶催化活性得到提高。

### 2.7.3 L83 结构分析

83 位点的任何突变都会导致酶失活, 证明该位点对于 CESH(D)的催化机制具有重要意义。观察 83 位点在野生型 CESH(D)中的空间位置(图 12), L83 位于底物结合口袋的上方, 并且该位置是底物通道的 loop 区, 而 loop 区域的改变则会对底物通道的构象产生很大的影响<sup>[34]</sup>, 因此推测 83 位点的任何突变会使得底物结合口袋构象发生极大的负向改变从而导致酶失活。

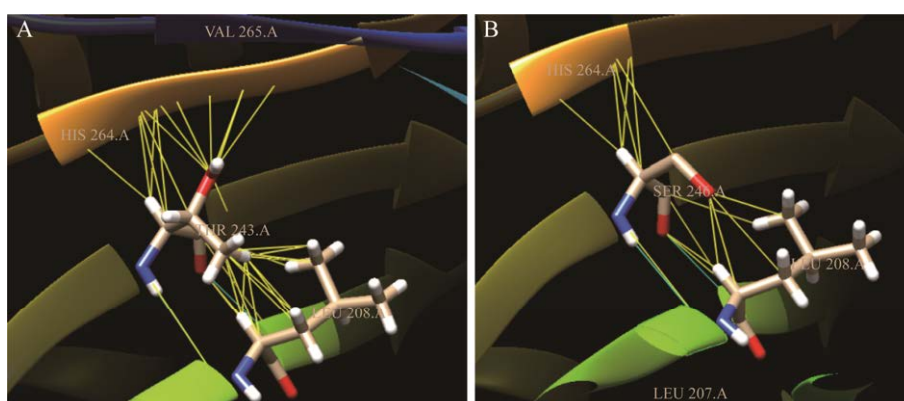


图 11 223 位点与周围氨基酸的相互作用示意图 A: 野生型 CESH(D). B: 突变体 T223S

Figure 11 Interaction of site 223 with surrounding amino acids. A: Wild-type CESH(D). B: Mutant T223S.

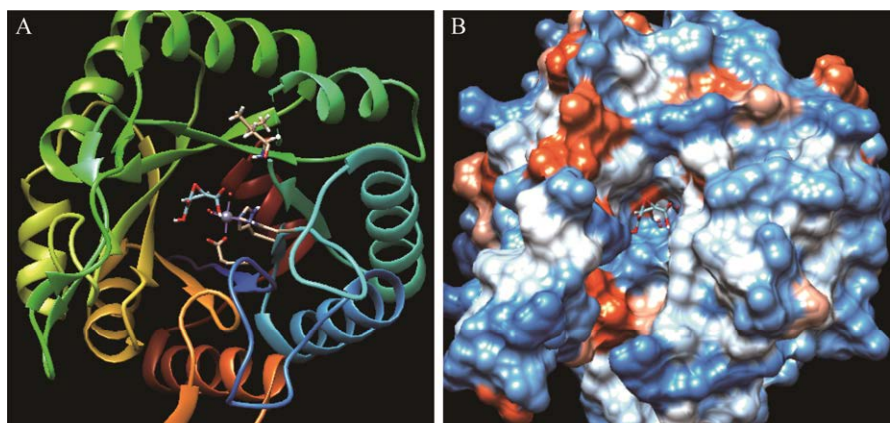


图 12 83 位点在野生型 CESH(D)中的空间位置信息 A: 肽链结构. B: 疏水性结果

Figure 12 Spatial location information of site 83 in wild-type CESH(D). A: Peptide chain structure. B: Hydrophobicity results.



### 2.7.4 V77I 结构分析

77 位点由 Val 突变为 Ile 后, 侧链基团变大, 增加了一个亚甲基, 与位于右前方  $\beta$  折叠结构上的 V46 的相互作用力增强, 并且与位于左前方的  $\alpha$  螺旋结构上与 A35 和 R39 形成新的相互作用力(图 13)。

推测突变体酶活提高的原因可能是突变使该位点周围的  $\alpha$  螺旋与  $\beta$  折叠结构之间相互作用加强, 使该区域酶结构更加稳定, 还可能增加了关键催化氨基酸 H47<sup>[29]</sup>与其他氨基酸的相互作用, 使活性中心周围的区域稳定性提高, 从而使酶催化活性得到提高<sup>[35]</sup>。具体影响酶催化活性的机制还需进一步研究。

### 2.7.5 D183E 结构分析

图 14 展示了 83 位点的空间位置, 其位于酶蛋白表面, 由 Asp 突变为 Glu 后, 氨基酸极性未发生改变。侧链基团变大, 增加了一个亚甲基基团, 与 M176 的相互作用力消失, 与 Q219 的相互作用力增强。因为该位点远离催化活性

中心, 所以其突变影响酶催化活性的机制还需要更加深入的研究。

## 3 讨论与结论

D(-)-酒石酸在食品、医药和化学合成等行业具有重大应用潜力。相较于传统的化学合成法, 利用 CESH(D)的生物转化法制备 D(-)-酒石酸生产成本低, 反应条件温和, 转化率和产品纯度高, 更适合 D(-)-酒石酸的工业生产。然而野生型 CESH(D)较低的酶活力水平使其在实际的 D(-)-酒石酸生产应用中受到一定限制。

本研究以来源于 *Bordetella* sp. BK-52 的顺式环氧琥珀酸水解酶 CESH(D)为研究对象, 通过定向进化手段结合半理性设计策略对 CESH(D)的催化活性进行改造。结果得到 4 个正向突变体 L231P/N226S、V77I、D183E 和 T223S, 催化酶活相较 WT 分别提高了 2.2、1.6、1.5 和 1.4 倍。酶学性质研究发现突变体 L231P/N226S

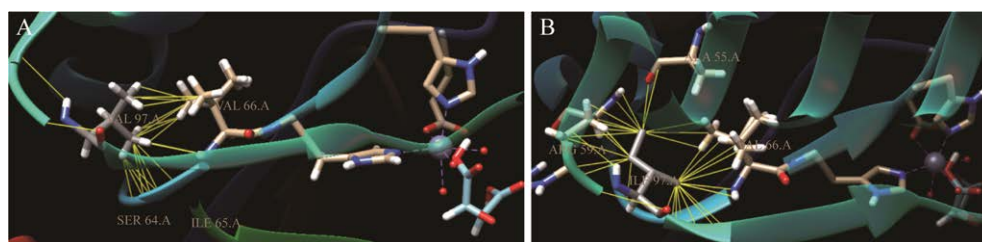


图 13 77 位点与周围氨基酸的相互作用示意图 A: 野生型 CESH(D). B: 突变体 V77I  
Figure 13 Interaction of site 77 with surrounding amino acids. A: Wild-type CESH(D). B: Mutant V77I.

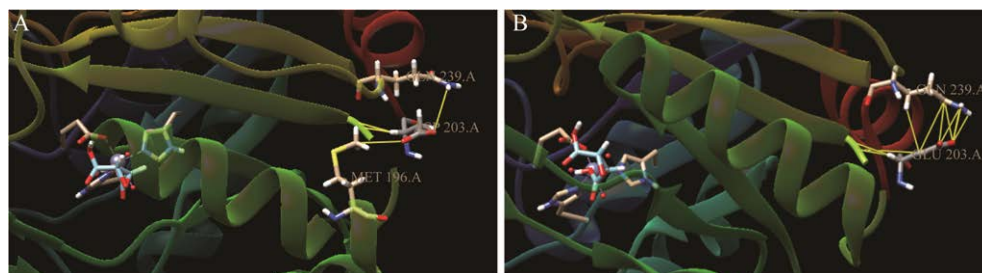


图 14 183 位点与周围氨基酸的相互作用示意图 A: 野生型 CESH(D). B: 突变体 D183E  
Figure 14 Interaction of site 183 with surrounding amino acids. A: Wild-type CESH(D). B: Mutant D183E.

和 D183E 的温度稳定性以及突变体 L231P/N226S 和 T223S 的 pH 稳定性相较于 WT 都有所提高。动力学分析发现 4 个正向突变体的  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  值分别是 WT 的 1.85、1.40、1.27 和 1.30 倍,进一步证明了其催化效率的提高。通过分子对接等手段对各突变位点影响 CESH(D)催化活性的原因进行了推测分析,发现酶活提高的主要原因可能是突变导致底物结合口袋的改变,从而使底物与酶的主要催化残基结合更加紧密,相互作用增强。

通过实验获得了温度和 pH 稳定性好、酶催化活性明显提高的正向突变体,后续研究可以通过结合更多的生物信息学分析,如利用 CAVER 软件以及分子动力学(MD)模拟结合蛋白晶体结构分析突变前后酶底物结合通道的直径变化、蛋白构象能量以及酶分子与底物相互作用能的变化等,获取更多 CESH(D)结构-功能的相关信息,以进一步改造优化其酶学特性,继而拓宽 D(-)-酒石酸的工业应用。

## REFERENCES

- [1] KODAMA S, YAMAMOTO A, MATSUNAGA A, HAYAKAWA K. Direct chiral resolution of tartaric acid in food products by ligand exchange capillary electrophoresis using copper(II)-D-quinic acid as a chiral selector[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 932(1-2): 139-143.
- [2] SU YL, YANG CS, TENG SJ, ZHAO G, DING Y. Total synthesis of four diastereoisomers of goniofufurone from D-(-)- or L-(+)-tartaric acid[J]. *Tetrahedron*, 2001, 57: 2147-2153.
- [3] PABBA J, VASELLA A. Synthesis of D-gluco-, L-ido-, D-galacto-, and L-altro-configured glycaro-1,5-lactams from tartaric acid[J]. *Tetrahedron Letters*, 2005, 46(21): 3619-3622.
- [4] LI X, XU TC, LU HB, MA XH, KAI L, GUO KP, ZHAO YH. Purification and characterization of a *cis*-epoxysuccinic acid hydrolase from *Bordetella* sp. strain 1-3[J]. *Protein Expression Purify*, 2010, 69(1): 16-20.
- [5] XUAN JS, FENG YG. Enantiomeric tartaric acid production using *cis*-epoxysuccinate hydrolase: history and perspectives[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2019, 24(5): 903.
- [6] CUI GZ, WANG S, LI YF, TIAN YJ, FENG YG, CUI Q. High yield recombinant expression, characterization and homology modeling of two types of *cis*-epoxysuccinic acid hydrolases[J]. *The Protein Journal*, 2012, 31: 432-438.
- [7] NIRANTAR SR. Directed evolution methods for enzyme engineering[J]. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2021, 26(18): 5599.
- [8] HOFFMANN G, BÖNSCH K, GREINER-STÖFFELE T, BALLSCHMITER M. Changing the substrate specificity of P450cam towards diphenylmethane by semi-rational enzyme engineering[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2011, 24(5): 439-446.
- [9] FANG W, YANG Y, ZHANG XX, YIN Q, ZHANG XC, WANG XT, FANG ZM, XIAO YZ. Improve ethanol tolerance of  $\beta$ -glucosidase Bgl1A by semi-rational engineering for the hydrolysis of soybean isoflavone glycosides[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 227: 64-71.
- [10] MIYAZAKI K. MEGAWHOP cloning: a method of creating random mutagenesis libraries via megaprimer PCR of whole plasmids[J]. *Methods in Enzymology*, 2011, 498: 399-406.
- [11] ZHAO F, ZHANG Y, LI H, SHI RJ, HAN SQ.  $\text{CaCl}_2$ -heat shock preparation of competent cells of three *Pseudomonas* strains and related transformation conditions[J]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao = the Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(3): 788-794.
- [12] PAN HF, XIE ZP, BAO WN, ZHANG JG. Optimization of culture conditions to enhance *cis*-epoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 42(2): 133-138.
- [13] XU SQ, WANG L, PAN XC. An evaluation of combined strategies for improving the performance of molecular docking[J]. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 2021, 19(2): 2150003.
- [14] MARTINEZ X, KRONE M, ALHARBI N, ROSE AS, LARAMEE RS, O'DONOGHUE S, BAADEN M, CHAVENT M. Molecular graphics: bridging structural biologists and computer scientists[J]. *Structure: London, England*: 1993, 2019, 27(11): 1617-1623.
- [15] CORRADI HR. Using crystallographic data to facilitate students' discovery of how protein models are produced—an activity illustrating the effect of resolution on model quality[J]. *Journal of Chemical*



- Education, 2015, 92(12): 2117-2119.
- [16] QUAN LJ, LÜ Q, ZHANG Y. STRUM: structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation[J]. *Bioinformatics*, 2016, 32(19): 2936-2946.
- [17] DEHOUCK Y, KWASIGROCH JM, GILIS D, ROOMAN M. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 151.
- [18] PARKER JMR, HODGES RS. HomologyPlot: searching for homology to a family of proteins using a database of unique conserved patterns[J]. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1994, 8(2): 193-210.
- [19] TSENG WC, LIN JW, WEI TY, FANG TY. A novel megaprimer and ligase-free, PCR-based, site-directed mutagenesis method[J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 375(2): 376-378.
- [20] CARLE V, KONG XD, COMBERLATO A, EDWARDS C, DÍAZ-PERLAS C, HEINIS C. Generation of a 100-billion cyclic peptide phage display library having a high skeletal diversity[J]. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 2021, 34: gzab018.
- [21] BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [22] BAO WN, PAN HF, ZHANG ZH, CHENG YQ, XIE ZP, ZHANG JG, LI YQ. Analysis of essential amino acid residues for catalytic activity of *cis*-epoxysuccinate hydrolase from *Bordetella* sp. BK-52[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98: 1641-1649.
- [23] GASHTASBI F, AHMADIAN G, NOGHABI KA. New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 64-65: 17-23.
- [24] PRITCHARD L, CORNE D, KELL D, ROWLAND J, WINSON M. A general model of error-prone PCR[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2005, 234(4): 497-509.
- [25] WANG TW, LIANG C, HOU YJ, ZHENG MY, XU HJ, AN YF, XIAO S, LIU L, LIAN SB. Small design from big alignment: engineering proteins with multiple sequence alignment as the starting point[J]. *Biotechnology Letters*, 2020, 42(8): 1305-1315.
- [26] REETZ MT, BOCOLA M, WANG LW, SANCHIS J, CRONIN A, ARAND M, ZOU JY, ARCHELAS A, BOTTALLA AL, NAWORYTA A, MOWBRAY SL. Directed evolution of an enantioselective epoxide hydrolase: uncovering the source of enantioselectivity at each evolutionary stage[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, 131(21): 7334-7343.
- [27] DEHOUCK Y, GROSFILS A, FOLCH B, GILIS D, BOGAERTS P, ROOMAN M. Fast and accurate predictions of protein stability changes upon mutations using statistical potentials and neural networks: PoPMuSiC-2.0[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(19): 2537-2543.
- [28] KUMAR V, RAHMAN S, CHOUDHRY H, ZAMZAMI MA, SARWAR JAMAL M, ISLAM A, AHMAD F, HASSAN MI. Computing disease-linked SOD1 mutations: deciphering protein stability and patient-phenotype relations[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4678.
- [29] DONG S, LIU X, CUI GZ, CUI Q, WANG XQ, FENG YG. Structural insight into the catalytic mechanism of a *cis*-epoxysuccinate hydrolase producing enantiomerically pure D(-)-tartaric acid[J]. *Chemical Communications: Cambridge, England*, 2018, 54(61): 8482-8485.
- [30] WEN S, TAN TW, ZHAO HM. Improving the thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(2): 248-253.
- [31] ZHANG HT, SANG JC, ZHANG Y, SUN TW, LIU H, YUE R, ZHANG J, WANG HK, DAI YJ, LU FP, LIU FP. Rational design of a *Yarrowia lipolytica* derived lipase for improved thermostability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 1190-1198.
- [32] ZIEGELMANN-FJELD KI, MUSA MM, PHILLIPS RS, ZEIKUS JG, VIEILLE C. A thermoanaerobacter ethanolicus secondary alcohol dehydrogenase mutant derivative highly active and stereoselective on phenylacetone and benzylacetone[J]. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 2007, 20(2): 47-55.
- [33] KONG XD, MA Q, ZHOU JH, ZENG BB, XU JH. A smart library of epoxide hydrolase variants and the top hits for synthesis of (S)- $\beta$ -blocker precursors[J]. *Angewandte Chemie: International Edition in English*, 2014, 53(26): 6641-6644.
- [34] OUEDRAOGO D, SOUFFRANT M, VASQUEZ S, HAMELBERG D, GADDA G. Importance of loop L1 dynamics for substrate capture and catalysis in *Pseudomonas aeruginosa* D-arginine dehydrogenase[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(19): 2477-2487.
- [35] XIE Y, AN J, YANG GY, WU G, ZHANG Y, CUI L, FENG Y. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(11): 7994-8006.