

• 工业生物技术 •

结构指导的玉米赤霉烯酮水解酶的热稳定性改造

官媛林, 张萌, 许菲*

江南大学生物工程学院 工业微生物教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

官媛林, 张萌, 许菲. 结构指导的玉米赤霉烯酮水解酶的热稳定性改造[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3336-3350.

GUAN Ailin, ZHANG Meng, XU Fei. Structure-guided engineering for improving the thermal stability of zearalenone hydrolase[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3336-3350.

摘要: 玉米赤霉烯酮是世界上污染最为广泛的一种镰刀菌(*Fusarium*)毒素, 严重危害牲畜以及人类的健康。来源于粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*)的玉米赤霉烯酮水解酶(zearalenone hydrolase, ZHD)能有效降解饲料中的玉米赤霉烯酮, 然而饲料加工中的高温环境限制了该酶的应用。基于结构特征的理性设计可为酶的热稳定性改造提供指导。本研究首先基于蛋白质结构比对(multiple structure alignment, MSTA)筛选 ZHD 的结构灵活区, 随后基于序列保守性打分以及构象自由能计算设计突变文库, 得到基于 136 号和 220 号残基的 9 个单点突变设计。结果表明, 9 个突变体的热熔融温度(T_m)提高了 0.4–5.6 °C, 其中 S220R 和 S220W 热稳定性表现最好, T_m 分别提高了 5.6 °C 和 4.0 °C, 45 °C 下的热半失活时间分别延长了 15.4 倍和 3.1 倍, 相对酶活分别为野生型的 70.6% 和 57.3%。分子动力学模拟分析表明突变位点及附近区域的作用力得到了增强, 突变体 S220R 和 S220W 的 220-K130 氢键成键概率分别增加了 37.1% 和 19.3%、K130-D223 盐桥成键概率分别增加了 30.1% 和 12.5%, 为 ZHD 热稳定性的提高作出了贡献。这项工作表明结合天然酶的结构比对、序列分析及自由能计算的热稳定性改造策略的可行性, 并获得了热稳定性增强的 ZHD 变体, 为 ZHD 在工业上的应用打下基础。

关键词: 玉米赤霉烯酮水解酶; 热稳定性; 蛋白质结构比对; 分子动力学模拟

资助项目: 国家自然科学基金(22078129); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX22_2420)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22078129) and the Postgraduate Research & Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX22_2420).

*Corresponding author. E-mail: feixu@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-10-27; Accepted: 2023-02-02; Published online: 2023-02-13

Structure-guided engineering for improving the thermal stability of zearalenone hydrolase

GUAN Ailin, ZHANG Meng, XU Fei*

Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Zearalenone is one of the most widely polluted *Fusarium* toxins in the world, seriously endangering livestock and human health. Zearalenone hydrolase (ZHD) derived from *Clonostachys rosea* can effectively degrade zearalenone. However, the high temperature environment in feed processing hampers the application of this enzyme. Structure-based rational design may provide guidance for engineering the thermal stability of enzymes. In this paper, we used the multiple structure alignment (MSTA) to screen the structural flexibility regions of ZHD. Subsequently, a candidate mutation library was constructed by sequence conservation scoring and conformational free energy calculation, from which 9 single point mutations based on residues 136 and 220 were obtained. The experiments showed that the thermal melting temperature (T_m) of the 9 mutants increased by 0.4–5.6 °C. The S220R and S220W mutants showed the best thermal stability, the T_m of which increased by 5.6 °C and 4.0 °C compared to that of the wild type. Moreover, the thermal half-inactivation time at 45 °C were 15.4 times and 3.1 times longer, and the relative activities were 70.6% and 57.3% of the wild type. Molecular dynamics simulation analysis showed that the interaction force at and around the mutation site was enhanced, contributing to the improved thermal stability of ZHD. The probability of 220-K130 hydrogen bond of the mutants S220R and S220W increased by 37.1% and 19.3%, and the probability of K130-D223 salt bridge increased by 30.1% and 12.5%, respectively. This work demonstrated the feasibility of thermal stability engineering strategy where the structural and sequence alignment as well as free energy calculation of natural enzymes were integrated, and obtained ZHD variants with enhanced thermal stability, which may facilitate the industrial application of ZHD.

Keywords: zearalenone hydrolase; thermal stability; protein structure alignment; molecular dynamics simulation

霉菌毒素污染一直是全球畜牧业和食品工业的重大威胁。据联合国粮农组织统计,全世界谷物供应中有 25%以上受霉菌毒素污染而不能食用,由此造成的经济损失高达数千亿美元^[1],而且毒素的毒性还严重危害牲畜以及人类的健康^[2-4],所以从农产品中去除霉菌毒素是一个世界性的问题。玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)

是世界上污染最为广泛的一种镰刀菌毒素^[5],哺乳动物因食用含有 ZEN 的饲料而在体内积累毒素,并造成一系列由雌性激素紊乱而引起的危害,主要表现为免疫抑制、食欲下降以及生长缓慢,同时 ZEN 对母畜繁殖产生障碍,持续中毒易引发不孕不育、流产和死胎现象^[6]。

目前已有的 ZEN 脱毒方法包括物理法(热

解、辐射处理等)、化学法(氧化、还原、水解等)和生物法(微生物降解、酶法等)^[7]。然而物理法与化学法脱毒存在明显的缺陷,破坏谷物和饲料的营养成分、对产品造成二次污染、导致食品价值降低等^[8]。因此,反应环境温和、水解能力高效和低成本生物酶法脱毒在食品和饲料脱毒工业中展示出巨大的前景。目前从粉红螺旋聚孢霉(*Clonostachys rosea*) IFO 7063 分离出的 ZEN 内酯水解酶 ZHD101 能有效水解 ZEN 及其衍生物的内酯环,达到脱毒的效果^[9]。然而将酶催化剂应用到现有工业的过程常常对酶的耐热性有较高的需求。耐热酶可以减少反应过程的时间,并且相较于中温酶减少了反应混合物冷却再加热过程的能量消耗,耐热酶在环境温度下使用,可重复利用,且在固定化中易于回收^[10]。ZHD101 的最适温度在 37–45 °C, 50 °C 会使得 ZHD101 丧失大部分活性^[11],这就限制了该酶在工业上的应用,因此 ZHD101 的热稳定性改造显得尤为重要。

蛋白质工程领域长期致力于提高酶的热稳定性,近年来随着计算机技术的发展,计算设计改造酶热稳定性的方法由于人力成本低、实验室进化时间短等优点,广受科研界的关注^[12]。目前已有多种计算机辅助的蛋白质改造策略被开发出来,例如同源序列比对^[13]、蛋白质构象自由能计算^[14-15]、二硫键设计^[16]等,这些方法依赖进化信息、能量信息来提高蛋白质的热稳定性。其中 PROSS 计算设计策略又通过将序列保守性信息与蛋白质构象自由能计算相结合,预测了包含 51 个突变位点的酶变体,将模式蛋白的 T_m 提高了 20 °C^[14]。此外,基于结构特征的蛋白质改造策略引起了科学家的兴趣。ZHD101 作为一种典型的 α/β 水解酶,其晶体结构(PDB ID: 3WZL)已被解析,具有一个结构灵活的帽子区域和结构稳定的催化结构域,同时通过丙氨酸扫描

确认了 ZHD101 水解 ZEN 的 Ser102-His242-Glu126 催化三联体及其他关键残基^[9]。 α/β 水解酶超家族酶类的成员通常共享具有相似关键残基的基本催化支架,这类催化支架在进化中保持高度的结构相似性,然而这些酶在热稳定性、酶活性上存在很大的差异^[13]。该类酶往往还具有一个结构灵活区域、环区或者帽子区域(cap domain),有研究表明这是形成酶性质差异的原因之一^[9,17-18]。这部分区域由于暴露在溶液表面,在与溶剂和底物分子发生相互作用时会产生较大的构象变化,而这种结构上的灵活性、多变性,使其成为了蛋白质热稳定性改造的热点区域。例如,基于两种嗜热糖苷酶的结构灵活区域的移植互换,得到的酶变体在 70 °C 下的半衰期延长 11.8 倍^[19];对定向进化改造后的蛋白酶分析,发现大多数突变位点都位于结构灵活的区域,其热稳定性能达到嗜热酶的强度^[20]。将天然酶普适的计算设计改造策略与 α/β 水解酶特征结构分析相结合,可以弥补单一计算设计策略的局限性,减少设计中的假阳性概率,从而实现高效的改造策略开发。

本研究以 ZHD101 为研究对象,首先通过多蛋白质结构比对筛选出结构灵活区,进一步对灵活区域残基进行序列保守性分析和构象自由能计算,结合 3 种策略,从结构、进化和能量多方面因素筛选获得潜在的提高热稳定性的突变文库,以期开发出热稳定性增强的 ZHD101 变体,拓展其工业应用范围,并为蛋白质的热稳定性改造提供新的计算设计策略。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

表达载体 pET-28a(+) 与大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)菌株,购自 Novagen

公司。玉米赤霉烯酮水解酶基因 *zhd101*, 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS (premix)高保真 PCR 酶、DL 10 000 DNA Marker 以及 Premixed Protein Maker 购于 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒以及 DNA 胶回收试剂盒购于爱思进生物技术有限公司; 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; PCR 引物由亦欣生物科技(上海)有限公司合成; 玉米赤霉烯酮购于 Sigma-Aldrich 公司。甲醇与乙腈为市售高效液相色谱纯, 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质结构比对

基于蛋白质结构比对筛选出结构灵活区域的步骤如下: (1) 首先, 基于 ZHD101 的晶体结构(PDB ID: 3WZL), 利用 mTM-align^[21]服务器的第一个模块构建蛋白质结构文库, mTM-align 算法以 TM-score 大于 0.5 为筛选条件生成蛋白质结构文库, TM-score 分值表明了这些结构与目的蛋白质的结构相似性打分, 相似性越高分值越接近 1; (2) 对蛋白质结构文库除冗余(排除同类酶的变体), 通过蛋白质间成对的 TM-score 分值生成基于结构的系统发育树; (3) 进一步通过检索蛋白质的热稳定性信息, 选出 6 个代表性的 PDB 结构。利用 mTM-align 服务器的第二个模块, 生成所选蛋白质的多蛋白质结构比对(multiple structure alignment, MSTA)结果, 在 MSTA 结果中, 对多蛋白质序列和结构之间进行匹配, 并计算配对残基之间的距离, 将序列对齐有空位或配对残基距离大于等于 4 Å 的区域认为是灵活的, 并作为热稳定性改造的候选区域。

1.2.2 构象自由能计算

基于 ZHD101 的晶体结构, 对每个残基进行

虚拟饱和突变。利用基于力场的能量算法(rosetta_cartesian_ddg)计算出 ZHD101 虚拟饱和和突变体的构象自由能差值($\Delta\Delta G$)^[14], 计算公式如下:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{mutation}} - \Delta G_{\text{WT}}$$

其中, ΔG 表示蛋白质解折叠自由能差值。

Rosetta_Cartesian_ddg 算法^[22]: 首先对每个虚拟突变体使用 FastRelax 进行优化, 确定野生型以及点突变氨基酸最佳的侧链排布方式; 再使用卡迪尔空间版本的 FastRelax 对局部区域(点突变位置 6 Å 范围内)进行彻底优化以获得 Relax 后的突变体结构; 最后评估野生型以及突变型蛋白的能量差, 并使用能量函数特异性的校正因子对 $\Delta\Delta G$ 进一步矫正, 能量单位为 kcal/mol。

1.2.3 序列保守性分析

基于蛋白质的序列信息, ConSurf^[23-25]服务器 (<https://consurf.tau.ac.il/consurf-old.php>) 可以根据同源序列之间的系统发育关系来估算蛋白质不同氨基酸位置的序列保守性。ZHD101 的晶体结构被提交到 ConSurf 服务器, 使用默认参数计算各个残基的序列保守性分数(consurf score), Consurf score 分值从位点可变到位点保守为 1-9 共 9 个离散等级, 并将数值按照颜色投影在蛋白质的结构中^[26-27]。

1.2.4 分子动力学模拟

分子动力学模拟使用 AMBER99SB-ILDN 力场在 Gromacs 5.0.4 软件中实现^[28]。以 ZHD101 的晶体结构(PDB ID: 3WZL)作为分子动力学模拟的初始结构, 突变体初始构象通过 PyMOL (<http://www.pymol.org>)进行氨基酸替换获得。首先将蛋白质置于正方体的水盒子中, 采用 TIP3P 模型的水分子^[29], 其中范德华相互和静电相互作用的最小截止距离为 12 Å。随后采用 Steepest Descent 方法^[30]对模拟系统进行能量最小化。接着通过 Velocity Rescaling 算法保持体系温度 310 K,

并且使用 Berendsen 的弱耦合方法控制压力为 1 bar^[31], 将模拟的时间步长设置为 2 fs, 先后进行 1 ns *NVT* (*N* 为粒子数, *V* 为体积, *T* 为温度), 1 ns *NPT* (*N* 为粒子数, *P* 为压力, *T* 为温度) 的模型优化, 最终进行开放限制的 200 ns *NPT* 平衡模拟。

在基于 MD 的作用力的分析中, 氢键的定义为: 采用几何准则定义氢键, 两个参数分别为供体(N)-受体(O)的距离(RNO)和 3 个原子之间的 $\angle HNO$, 其截断值为 3.5 Å 和 30°^[32]; 盐桥的定义为: 带正电(Arg 或 Lys)氨基酸酰胺基团中的氮原子与带负电(Glu 或 Asp)氨基酸羧酸酯基团中的氧原子之间的最小距离, 其截断值为 4 Å^[33]。

1.2.5 定点突变及表达纯化

以质粒 pET28a-zhd101 为模板, 根据突变位点设计 PCR 上下游引物(表 1)进行全质粒 PCR, 对野生型的特定位点进行突变。将 PCR 产物回收后转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中^[34]。

表 1 本研究使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
S220Y-F	CCGACAGAGTATTTCTTCGAC	21
S220Y-R	ATACTCTGTCGGGGTGGCGGC	21
S220R-F	CACCCCGACAGAGCGTTTCTTCGACAATATC	31
S220R-R	CTCTGTCGGGGTGGCGGCGCCAACTG	26
S220L-F	CACCCCGACAGAGCTGTTCTTCGACAATATC	31
S220L-R	CTCTGTCGGGGTGGCGGCGCCAACTG	26
S220F-F	GACAGAGTTCTTCTTCGACAATATC	25
S220F-R	GAAGAACTCTGTCGGGGTG	19
S220W-F	GACAGAGTGGTTCTTCGACAATATC	25
S220W-R	GAAGAACCACTCTGTCGGGGTG	22
S220M-F	CGACAGAGATGTTCTTCGACAATATCG	27
S220M-R	GAAGAACATCTCTGTCGGGGTGGC	24
S136M-F	GCTGGATCACCTGATGAACACAGCAGTG	28
S136M-R	CATCAGGTGATCCAGCAGTTTGGTTCGGC	28
S136L-F	GCTGGATCACCTGCTGAACACAGCAGTG	28
S136L-R	CAGCAGGTGATCCAGCAGTTTGGTTCGGC	28
S136A-F	GCTGGATCACCTGGCAAACACAGCAGTG	28
S136A-R	TGCCAGGTGATCCAGCAGTTTGGTTCGG	27

将重组菌株接种至 LB 液体培养基于 37 °C 过夜培养(12 h 左右), 然后以 1% 的接种量转接至 TB 培养基, 培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。诱导结束后, 在 10 000 r/min 的离心条件下分离上清, 留下细胞沉淀备用, 随后利用超声破碎仪将细胞破碎超声(超声 2 s, 间歇 3 s, 30 min), 分离胞内上清和沉淀物。将胞内上清利用 0.22 μm 滤膜过滤除杂, 随后利用 His Trap HP 柱进行镍柱亲和层析。亲和层析的过程为: 首先用 A 液(0.02 mol/L Tris, 0.02 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)平衡 10 个柱体积, 再以 1 mL/min 的流速上样, 上样完成后用 5% 的 B 液(0.02 mol/L Tris, 0.5 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl)除去杂蛋白, 然后进行梯度洗脱(15%、25% 和 100% 的 B 液), 在 15% 梯度时获得目的蛋白, 最后用 Desalting 凝胶柱对目的蛋白进行脱盐处理。将纯化脱盐后的蛋白稀释至 0.2 mg/mL, 进行 SDS-PAGE 检验及后续的酶学实验。

1.2.6 圆二色谱实验

圆二色谱(circular dichroism, CD)实验用于测定酶及突变体的二级结构和热熔融温度(T_m)。首先将纯化脱盐处理后的酶液稀释到 0.2 mg/mL, 取 200 μ L 酶液加入光程为 0.1 cm 的石英比色皿进行 CD 实验。在 4 $^{\circ}$ C 条件下, 对样品进行 190–260 nm 范围内的全波长扫描, 设定每步的增量 0.5 nm, 平均扫描时间 2 ns, 依据测得全波长的特征吸收峰来确定蛋白质的二级结构。随后进行热变实验, 以最低吸收值(220 nm 波长)作为热变吸光值, 设置温度范围 4–80 $^{\circ}$ C, 升温速率为 1 $^{\circ}$ C/min, 测定其摩尔椭圆率的变化曲线。 T_m 通过以下公式估算:

$$F(T) = \frac{\theta(T) - \theta_U(T)}{\theta_F(T) - \theta_U(T)}$$

其中, $\theta(T)$ 是实验测得的椭圆率, $\theta_F(T)$ 和 $\theta_U(T)$ 是对折叠和展开的基线进行线性拟合得到的估计椭圆率, 其中 $F(T)=0.5$ 时, T 等于 T_m 。

1.2.7 酶活性测定

ZHD101 的酶活力是利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测样品中底物 ZEN 减少量的方法来表征。在 50 μ L 的 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5)中加入 10 μ L ZEN, 吹吸混匀后放置于 35 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 孵育结束后加入 40 μ L 纯酶液进行催化反应, 反应时间为 3 min, 用 200 μ L 的纯甲醇溶液作为反应终止剂。反应结束后经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 取 200 μ L 样品用于 254 nm 的吸光值下的 HPLC 检测, 色谱条件为: 流动相乙腈:水=60:40; 流速为 1 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。为了计算 ZHD101 的比活力, 用 BCA 法测定蛋白质浓度, 样品放置的温度统一为 37 $^{\circ}$ C, 时间为 3 min。酶活力(U)的定义: 在 37 $^{\circ}$ C, 在 1 min 内能降解 1 μ g/mL ZEN 所用的酶量。比活力(U/mg)按照如下公式的计算:

$$\frac{v \cdot k \cdot \Delta A / \Delta T}{m}$$

其中, k 为 ZEN 浓度标准曲线斜率; ΔA 表示(实验组峰面积–对照组峰面积), ΔT 表示反应时间, 单位: min; v 表示体系浓度(mL); m 表示反应体系中单位体积的酶含量(mg)。相对酶活定义为: 实验组比酶活力相较于对照组比酶活力的比值的百分比。

酶学参数的测定: (1) 最适反应温度(T_{opt}): 将预混溶液分别置于 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C 金属浴温度下预热 5 min, 然后加入 40 μ L 酶液反应 3 min, 最后加入 200 μ L 甲醇终止反应, 通过高效液相色谱法测定剩余底物量来确定最适反应温度。(2) 热半失活温度(T_{50}): 将酶液按每管 40 μ L 分装, 分别在 20 $^{\circ}$ C、25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、65 $^{\circ}$ C 的金属浴温度下孵育 10 min 后, 立即冰上放置 10 min。将预混溶液在最适反应温度下预热 5 min, 然后分别加入 40 μ L 经过热处理与冰上冷却的酶液, 反应 3 min, 然后加入 200 μ L 甲醇终止反应, 通过高效液相色谱法测定剩余底物量计算得到热半失活温度, 以样品中最高酶活力为 100% 计算其余温度下的相对酶活。(3) 热半失活时间($t_{1/2}$): 将酶液按每管 40 μ L 分装, 在 45 $^{\circ}$ C 的金属浴温度下, 分别孵育 0、5、10、15、20、25、30 min, 孵育时间到后立即与预混体系进行反应, 加入 200 μ L 甲醇终止反应后, 通过高效液相色谱法测定剩余底物量计算得到热半失活时间, 以 0 时刻样品的酶活力为 100% 计算其余时间下的相对酶活。

2 结果与分析

2.1 筛选热稳定性改造区域

为了筛选热稳定性改造区域, 首先通过 mTM-align^[21]算法, 得到与 ZHD101 序列相似性

低但结构相似性高的蛋白质文库, 该文库共计 2 580 个 PDB 结构, 其 TM-score 均大于 0.5, 其中有 42% 分布于 0.60–0.70 (1 092 个) 以及 43% 分布于 0.75–0.90 (1 108 个), 并且在这些结构中有 97% (2 504 个) 与 ZHD101 的序列相似性低于 20% (图 1A)。随后对文库除冗杂(排除同类酶的变体), 基于 TM-score 构建系统发育树(图 1B), 结果表明该文库中的蛋白质有超过 500 种来源, 行使 5 种以上的催化功能。随后检索文库中蛋白质的热稳定性数据, 筛选出 6 个代表性蛋白质与 ZHD101 的热稳定性进行比较(表 2), T_m 、 T_{50} 、 T_{opt} 和 $t_{1/2}$ 的差异表明这些蛋白质大都有比 ZHD101 更高的热稳定性(除 5XWZ 外)。

为了在整体相似的结构中寻找变化的区域, 将已选的 7 个蛋白质进行 MSTA 分析。结果表明结构变化大的区域主要位于 ZHD101 的帽子区域($\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 和 $\alpha 8$)及 $\alpha 9$ 和 $\alpha 10$ 螺旋(图 1C、1D 中的灰色区域), $\alpha 9$ 连接了帽子区域第二层的 $\alpha 8$, 而 $\alpha 10$ 位于蛋白质表面, 与 $\alpha 5$ 和 $\alpha 6$ 形成了蛋白质空腔。此外, N 端和 C 端由于暴露在溶液剂中而导致结构波动性大, 不作为结构非保守区域的讨论。之前的研究中基于 ZHD101 的柔性(RMSF 高)区域改造策略, 通过对 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 和 $\alpha 9$ 区域改造, 获得了 3 个热稳定性均提高 4 °C 以上的单点突变^[34]。为避免重复实验, 本研究选取 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 和 $\alpha 10$ 作为研究区域。

2.2 构建突变文库

为了在突变区域($\alpha 5$ 和 $\alpha 6$:L132–D157, $\alpha 10$:P217–G232, 共计 40 个残基)确立突变热点残基, 引入 ConSurf 序列保守性分析^[23], 筛选出该区域序列保守性低(consurf score<5)的残基位点。结果表明突变区域中序列保守性低的残基共有 24 个(图 2A)。这 24 个残基大部分都位于蛋白质表面, 部分残基的侧链指向溶剂区域。

为了进一步确定突变类型, 基于 ZHD101 的晶体结构, 在 Pymol 中对所选的 24 个残基进行虚拟饱和突变。使用 Rosetta_Cartesian_DDG 计算了每种突变情况引起的构象自由能变化($\Delta\Delta G$)。接着统计了该区域残基位点在虚拟饱和突变中展现出能量降低($\Delta\Delta G<0$)的可突变氨基酸种类(没有突变类型的除外), 突变类型最多能达到 16 种(S220), 次好的有 12 种(S136 和 N137), 可突变氨基酸种类越多说明此位点对氨基酸突变耐受性越好, 最终选择种类多于 10 种的残基位点(S136、N137、S220)作为突变热点残基(图 2B)。

最后, 分析了这 3 个残基位点所有单点饱和突变的 $\Delta\Delta G$ 值, 3 个残基对甲硫氨酸和亮氨酸的突变倾向高(平均 $\Delta\Delta G=-3.0$ kcal/mol), 而均排斥脯氨酸和甘氨酸突变。为了富集正向突变, 选取 $\Delta\Delta G<-3.0$ kcal/mol 的突变为潜在候选突变设计, 最终确定了 S136M/L/A、S220Y/W/R/M/L/F 共 9 种突变体(图 2C)。

表 2 蛋白质的结构相似性及热稳定性参数

Table 2 Structural similarity and thermal stability parameters of proteins

PDB ID, chain	TM-score	T_m (°C)	T_{50} (°C)	T_{opt} (°C)	T (°C), $t_{1/2}$ (min)	Reference
3WZL, A	1	40.0	43.9	35	45 °C, 5.5	[9]
5NG7, A	0.825 9	55.0	≈45	30	n.d.	[35]
5NFQ, A	0.805 1	85.0	≈75	50	n.d.	[35]
4UHC, A	0.825 4	n.d.	80–85	n.d.	n.d.	[36]
5FRD, A	0.801 0	n.d.	85–90	80	n.d.	[37]
2YH2, A	0.650 4	n.d.	n.d.	n.d.	110, 56	[38]
5XWZ, A	0.966 0	n.d.	n.d.	35	40, 2	[39]

“n.d.” indicates that the data has not been determined by experiment.

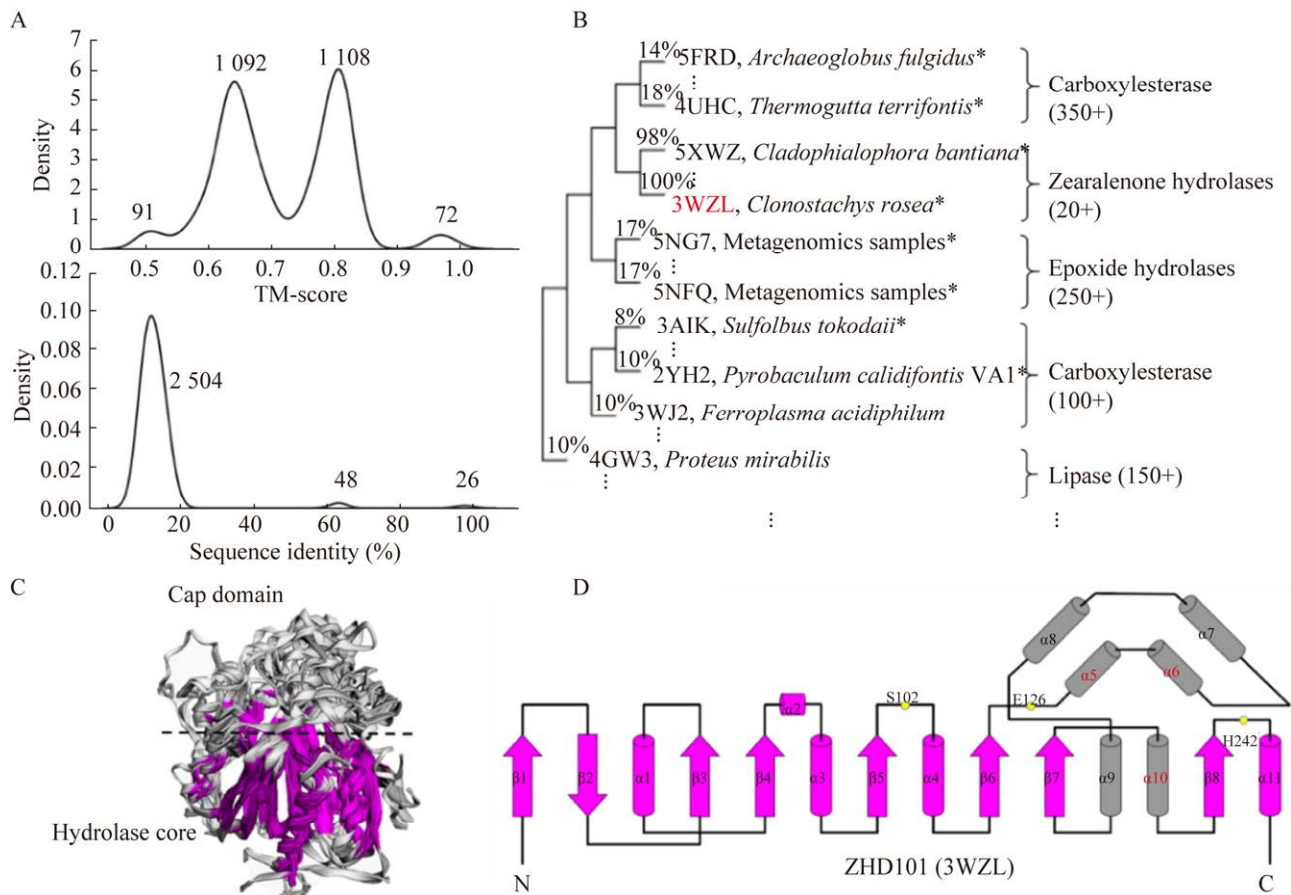


图 1 突变区域的选择 A: ZHD101 的 MSTA 文库中 TM-score 及序列相似性的核密度分布图. B: 基于结构的系统发育树. C: 所选蛋白质的结构比对. D: ZHD101 的蛋白质拓扑结构示意图

Figure 1 Selection of non-conserved regions of the structure. A: Kernel density distribution map of TM-score and sequence similarity in MSTA library of ZHD101. B: Phylogenetic tree of ZHD101 structural analogs, the information from left to right is enzyme PDB ID, source, function, quantity; The horizontal line is the sequence similarity between the corresponding PDB structure and ZHD101; The "*" next to the organisms indicates that it has thermal stability data. C: Structural alignment of the selected proteins. D: Schematic diagram of the protein topology of ZHD101, the yellow dots represent catalytic triads, the 'α' stands for alpha helix and 'β' stands for beta sheet.

2.3 野生型与突变体的表达纯化

突变体使用全质粒 PCR 方法构建并在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)中表达。将表达所得的蛋白质纯化后，采用 SDS-PAGE 进行验证，结果表明，野生型(WT)及突变体的分子量大小约为 29.0 kDa，与理论值相符，且纯度达到电泳纯(图 3)。

2.4 野生型与突变体的热稳定性及酶活性表征

利用圆二色光谱对 WT 及突变体进行热力学稳定性表征，在 4 °C 进行 190–260 nm 的全波长扫描，如全波长曲线所示(图 4A)，所有蛋白质全部折叠形成了正确的二级结构。在 4–80 °C 的范围内测定蛋白质热熔融过程中椭圆率的变

化情况。蛋白的热熔融温度(T_m)由 220 ns 波长下的热变曲线获得(图 4B)。表 2 展示了 WT 及 9 种突变体的 T_m 值, 9 种突变体的热力学稳定性都有提高($\Delta T_m=0.4-5.6$ °C, 表 3), 220 残基位点表现好的突变体为 S220R 和 S220W, 其 T_m 分别提高了 5.6 °C 和 4.0 °C, 次好的突变体 S220Y 的 T_m 提高了 1.8 °C; 136 位点表现好的 S136A、S136L, 其 T_m 提高了 1.7 °C 和 1.4 °C。

进一步测定了 WT 及突变体的酶活性, 表 3

中的酶活实验数据表明, 突变体的相对酶活性都有损失(相对酶活性为 38.2%–70.6%)。220 号残基的 6 个突变体, 其相对酶活性随着其热稳定性的提高而下降(除 S220R 突变外), 220 号残基热稳定性表现好的突变体 S220R 和 S220W 的相对酶活性分别为 56.1% 和 40.7%; 136 号残基的 3 个突变体也呈现同样的趋势, 热稳定性较高的 S136A 和 S136L 的相对酶活性分别为 38.2% 和 47.8%。

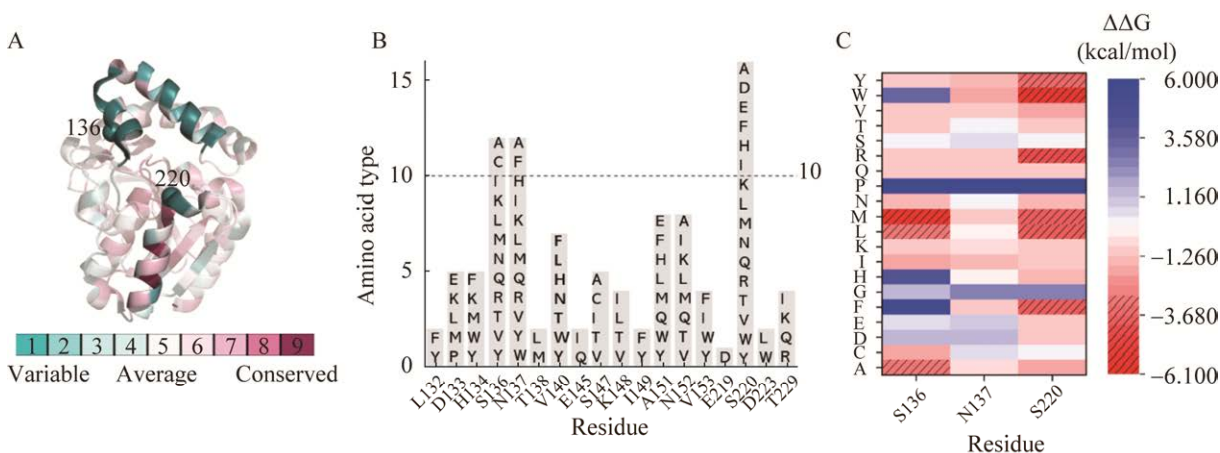


图 2 突变文库的构建 A: ZHD101 序列保守性分析. B: 氨基酸突变类型的统计. C: S136、N137、S220 残基的构象自由能($\Delta\Delta G$)热图, 斜线代表 $\Delta\Delta G < -3.0$ kcal/mol 的突变体

Figure 2 Construction of mutant library. A: Heatmap for conservation analysis of ZHD101, from the most variable fraction 1 being turquoise, to the middle conservative fraction 5 being white, to the most conservative fraction 9 being maroon. B: Statistics of amino acid mutation types. C: Conformational free energy ($\Delta\Delta G$) heatmap of selected residues (S136, N137, S220), slashes represent mutants with $\Delta\Delta G < -3.0$ kcal/mol.

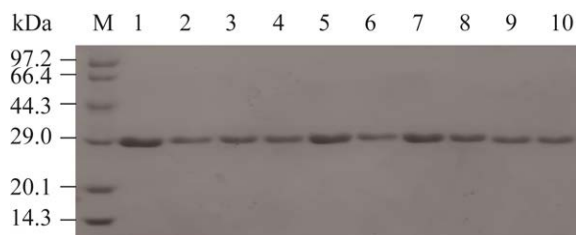


图 3 野生型 ZHD101 及其突变体在大肠杆菌中的表达纯化

Figure 3 Expression and purification of wild type ZHD and its mutants using *Escherichia coli* BL21(DE3). M: Premixed protein marker; 1: Purified wild type ZHD; 2–10: Purified protein of mutant S220R, S220F, S220M, S220Y, S220L, S220W, S136M, S136L, S136A.

2.5 突变体 S220R 和 S220W 的动力学稳定性表征

随后对 $\Delta T_m \geq 4.0$ °C 的突变体 S220R 和 S220W 进行动力学稳定性的表征。测量最适反应温度(T_{opt})、热半失活温度(T_{50})和热半失活时间($t_{1/2}$) (表 4, 图 5)。从最适反应温度(图 5A)可以看出突变体 S220R 和 S220W 的最适反应温度都向 45 °C 漂移, 相较于 WT 的最适反应温度 35 °C, 升高了 10 °C; S220R、S220W 的 T_{50} 也分别增加了 4.9 °C 和 3.9 °C (图 5B), 这与 T_m 的增加趋势相同; S220R 在 45 °C 条件下的 $t_{1/2}$ 为 90 min, S220W 在 45 °C 条件下的 $t_{1/2}$ 为 22 min,

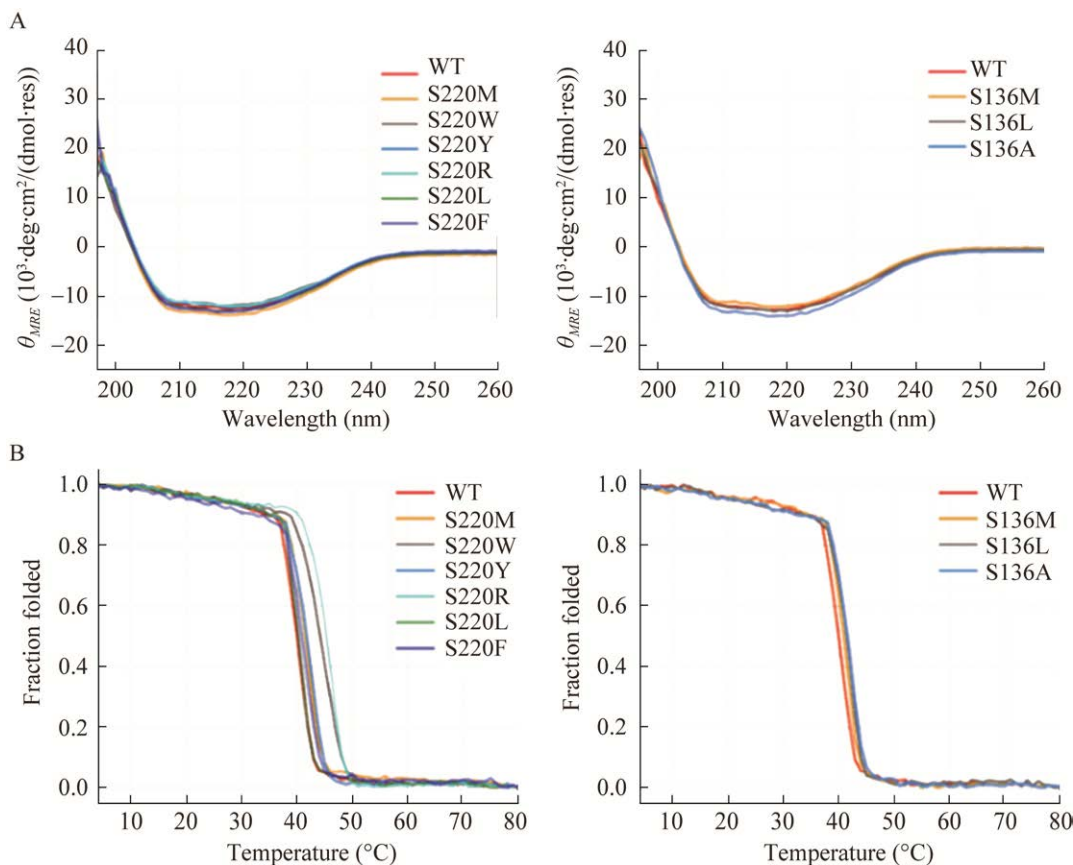


图 4 ZHD101 及其突变体的热力学稳定性的表征 A: 在 4 °C 下的 CD 光谱. B: 在 220 nm 处测定的热熔融曲线

Figure 4 Far-UV CD spectra and thermal denaturation of wild type and its mutants. A: CD spectra at 4 °C under pH 7, 20 mmol/L Tris-HCl buffer. B: Thermal melting curves monitored at 220 nm in Tris-HCl buffer. The samples were shown in colors as labeled in the plots.

表 3 野生型及突变体的热熔融温度、相对酶活性的测定及构象自由能变化(ΔΔG)

Table 3 Characteristics of wild type ZHD101 and its mutants including T_m , ΔT_m , relative activities, $\Delta\Delta G$

Mutant	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	Relative activity (%)	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)
WT	40.0±0.4	0.0	100.0±3.2	0
S220L	40.4±0.1	0.4	70.6±9.4	-3.798
S220F	40.9±0.1	0.9	61.6±2.2	-3.798
S220M	41.1±0.3	1.1	61.0±3.3	-3.972
S220Y	41.8±0.1	1.8	54.5±3.3	-3.330
S220W	44.0±0.4	4.0	40.7±9.8	-6.170
S220R	45.6±0.1	5.6	56.1±6.3	-4.235
S136M	40.9±0.1	0.9	69.3±2.9	-6.078
S136L	41.4±0.2	1.4	47.8±3.9	-3.031
S136A	41.7±0.1	1.7	38.2±7.6	-3.150

相较于 45 °C 下 WT 的 $t_{1/2}$ (5.5 min) 分别延长了 15.4 倍和 3.1 倍(图 5C); 突变体在 45 °C 时的相对酶活性相比于 35 °C 时有所提高, 表明酶在高温下的催化能力得到更多的保留。综合酶热力学稳定性及酶动力学稳定性的表征, 说明 S220R 和 S220W 这两种突变体对酶的热稳定性有正向的改善。

2.6 S220R 和 S220W 热稳定性提高的机理分析

为了探究 S220R 和 S220W 热稳定性提高的机理, 对 WT、S220R 和 S220W 进行了 200 ns 的分子动力学模拟。首先基于轨迹计算了蛋白质

表 4 WT、S220R 和 S220W 的稳定性表征

Table 4 Characterization of the stability of WT, S220R and S220W including T_m , ΔT_m , relative activities (35 °C and 45 °C), T_{opt} , T_{50} , $t_{1/2}$

Mutant	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	35 °C relative activity (%)	45 °C relative activity (%)	T_{opt} (°C)	T_{50} (°C)	$t_{1/2}$ (min)
WT	40.0±0.4	0.0	100.0±3.2	100.0±5.6	35.0	43.9	5.5
S220R	45.6±0.1	5.6	54.5±3.3	70.6±4.5	45.0	48.8	90.0
S220W	44.0±0.4	4.0	40.7±9.8	57.3±6.7	45.0	47.8	22.0

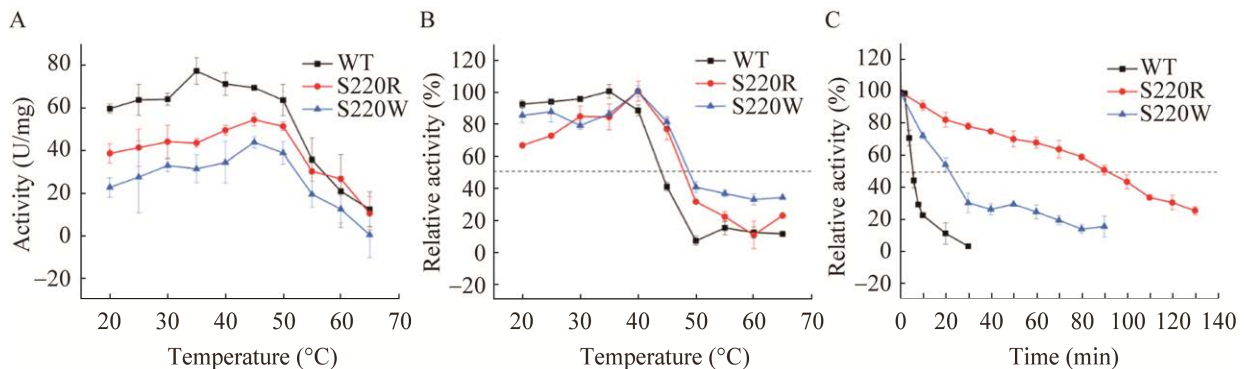
图 5 酶动力学稳定性的表征 A: 最适反应温度 T_{opt} . B: 热半失活温度 T_{50} . C: 45 °C 热半失活时间 $t_{1/2}$; 相对酶活指代各个突变体相对于自身最大值的酶活性

Figure 5 Characterization of enzyme (WT, S220R, S220W) kinetic stability. A: Optimal reaction temperature T_{opt} . B: Thermal half-inactivation temperature T_{50} . C: 45 °C thermal half-inactivation time $t_{1/2}$. The relative enzyme activity of the ordinate refers to the enzyme activity of each mutant relative to its own maximum value.

主链原子 $C\alpha$ 的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)及均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)。RMSD 值用来反映蛋白质结构整体的波动性, WT、S220R 和 S220W 的平均 RMSD 值分别是(1.6±0.2) Å、(1.9±0.2) Å 和 (1.5±0.3) Å, 均小于 3.2 Å^[40], 表明其构象在模拟体系中处于稳定状态(图 6A)。RMSF 值用来反映蛋白质残基的波动性, 对于 WT 及突变体, 其在 MD 模拟时长内具有较高 RMSF 值的区域与晶体结构中 B 因子所代表的柔性区域一致, 并且覆盖了帽子区域(残基位置 L132–P188 的 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 7$ 、 $\alpha 8$ 螺旋区域)(图 6B)。此外, 相较于 WT 帽子区域较高的构象波动性, S220R 突变体帽子区域残基的 RMSF 值有所降低, S220R 突变实现局部柔性区域的刚性化, 从而对酶整体热稳定性的提高有利。相比于 S220R 突变, S220W 突变体在帽

子区域的 RMSF 值略有下降, 变化不显著。

为了进一步解析突变体热稳定性提高的机制, 基于野生型和突变体 Rosetta_fastRelax 前后的结构和 MD 轨迹分析了突变位点附近区域的氢键或盐桥的距离分布及成键概率。首先, 220 位点无论是突变成 R 还是 W, 都可导致该残基的空间位置发生偏移, 这种空间位置的变化导致 220 残基的主链 O 原子有更大概率与 K130 残基侧链上的 N 原子形成主链-侧链氢键, 将该氢键命名为氢键 A (图 7), 氢键 A 的距离在 S220R_relax、S220W_relax 突变体(7.7 Å)和野生型 ZHD101 (7.1 Å)中略有差异(图 7A); MD 的结果显示, 相较于 WT, S220R 和 S220W 两个突变体的氢键 A 的成键距离在 3.5 Å 内的分布密度更大(图 7B、7C), 其成键概率分别增加了 37.1%和 19.3%。

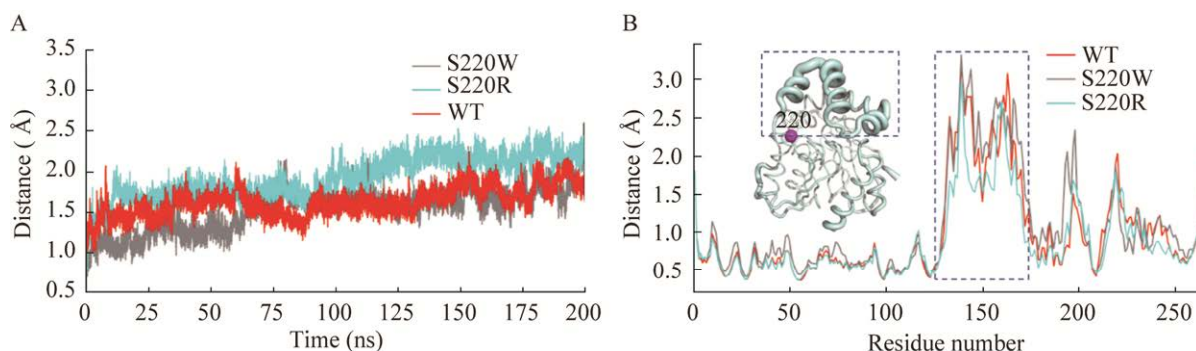


图6 分子动力学模拟分析 A: 均方根偏差. B: 均方根波动和 B 因子映射的蛋白质三级结构, 模型越粗代表 B 因子越大; 方框标出的为帽子区域

Figure 6 Molecular dynamics simulation analysis for wild type (red) and mutant S220R (cyan), S220W (grey). A: The root mean square deviation (RMSD). B: The root mean square fluctuation (RMSF) and protein tertiary structure revealed by B factor, a thick model represents a large B factor; The squares highlight the cap domain.

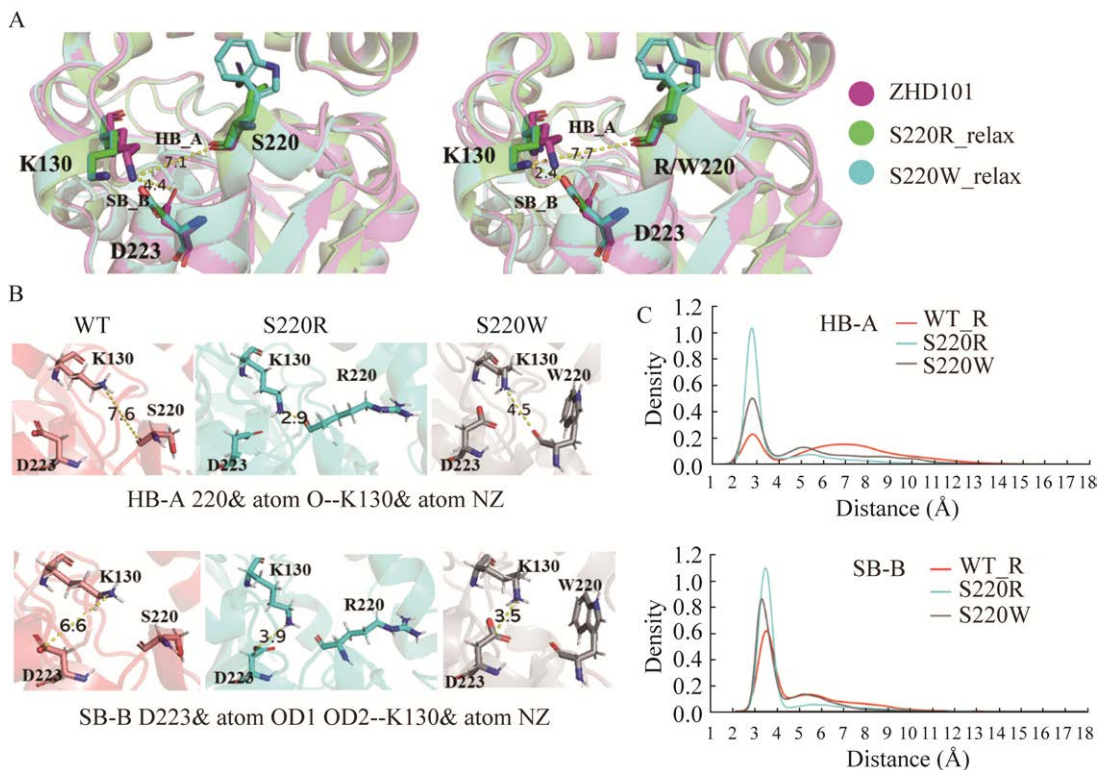


图7 氢键及盐桥作用力增强 A: 野生型 ZHD101、S220R_relax 和 S220W_relax 结构中的氢键 A 和盐桥 B 成键情况. B: WT 及突变体(S220R、S220W)在 K130、S/W/R220、D223 号残基中的相互作用力示意图. C: 分子动力学模拟中的氢键 A、盐桥 B 距离的核密度分布图

Figure 7 The enhancement of hydrogen bonds and salt bridge forces. A: Hydrogen bond A and salt bridge B bonding in wild-type ZHD101, S220R_relax and S220W_relax structures. B: Schematic diagram of the interaction force in residues K130, S/W/R220, and D223 of WT (red) and S220R (cyan), S220W (grey); The numbers between two residues represent distances in units of Å. C: Kernel density distribution plot of hydrogen bond A and salt bridge B distance in molecular dynamics simulation; The mutants were shown in colors as labeled in the plots.

此外, K130 残基的氨基侧链和 D223 残基的羧基侧链可以形成一对盐桥 B, 被 220 突变所带动的 K130 残基也使得盐桥 B 的作用力发生变化, S220R_relax、S220W_relax 突变体中盐桥 B 的距离(2.4 Å)比野生型的(4.4 Å)缩短(图 7A); MD 的结果显示, S220R、S220W 突变体盐桥 B 的成键距离在 4.0 Å 内的分布密度更大(图 7B-C), 与 WT 相比, 成键概率分别增加了 30.1% 和 12.5%。S220R 和 S220W 突变体的两组作用力都得到了增强, 并且其成键概率的增长也与实验所得 S220R ($\Delta T_m=5.6$ °C) 和 S220W ($\Delta T_m=4.0$ °C) 的热稳定性的增长趋势相同, S220R 突变所表现出的热稳定性更好, 其成键概率的涨幅也更大。这两组作用力对热稳定性的提高存在一定的贡献。

3 讨论与结论

本研究通过多蛋白质结构比对, 确定了 ZHD101 的结构灵活区域, 进一步通过序列保守性分析及构象自由能计算, 最终筛选出位于 220 号和 136 号残基位点的 9 种突变体($\Delta T_m=0.4-5.6$ °C), 其中表现最好的 2 个突变体 S220R 和 S220W, 相较于野生型, T_m 提高了 5.6 °C 和 4.0 °C; 最适反应温度均升高了 10 °C; 热半失活温度分别增加了 4.9 °C 和 3.9 °C; 45 °C 下的热半失活时间分别延长了 15.4 倍和 3.1 倍; 45 °C 下的相对酶活性分别为 70.6% 和 57.3%。综合酶热力学稳定性及酶动力学稳定性的表征, 说明 S220R 和 S220W 两种突变体确实对酶的热稳定性有正向的改善, 酶活性得到部分保留。最后, 通过分子动力学模拟, 表明 S220R 突变使得帽子区域残基的 RMSF 值降低, 实现局部柔性区域的刚性化, 从而对酶整体热稳定性的提高有利。S220R 和 S220W 两种突变都对其附近的作

用力网络进行了调整, 通过增强氢键 220-K130、盐桥 K130-D223 作用力来提高其热稳定性。同时, 针对酶稳定性的改造常常陷于酶活与稳定性的权衡, 尤其对于靠近活性中心残基的改造^[41]。220 号残基位于 ZHD101 底物结合口袋上方, 距离催化三联体质心 9.3 Å, S220 的突变体(S220L、F、M、R、Y、W)相较于野生型均有残基侧链的增大, 且突变后的氨基酸侧链增大, 酶活损失也增加, 突变为较大的氨基酸侧链可能导致底物进入活性区域困难、底物结合口袋区域的面积减小, 从而造成酶活性的损失, 也为后续研究提供了参考。

本研究表明, 基于结构、进化和能量多方面因素建立的蛋白质热稳定性改造计算设计策略能提供小而精的突变文库, 使得改造过程更加高效便利, 最终获得热稳定性增强的突变体, 此外在设计过程中对结构、序列信息的挖掘也为 ZHD101 的进一步功能改造, 如高化学选择性、区域选择性和催化活性等提供基础。

REFERENCES

- [1] ZINEDINE A, SORIANO JM, MOLTÓ JC, MAÑES J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): 1-18.
- [2] YU ZL, HU DS, LI Y. Effects of zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, 58(2): 187-193.
- [3] 郑继翠, 马阳阳, 刘江斌, 肖现民. 双酚 A 及玉米赤霉烯酮对神经母细胞瘤细胞周期蛋白表达的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2011, 38(1): 1-5.
ZHENG JC, MA YY, LIU JB, XIAO XM. Effect of bisphenol A and zearalenone on the expression of cell cycle protein in SK-N-SH human neuroblastoma cells[J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2011, 38(1): 1-5 (in Chinese).

- [4] LYAGIN I, EFREMENKO E. Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action[J]. *Molecules*, 2019, 24(13): 2362.
- [5] YUMBE-GUEVARA BE, IMOTO T, YOSHIKAWA T. Effects of heating procedures on deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone levels in naturally contaminated barley and wheat[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2003, 20(12): 1132-1140.
- [6] 张俊楠. 玉米赤霉烯酮解毒菌的筛选、解毒特性的研究与应用[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2021.
ZHANG JN. Isolation and identification of a bacterial strain with zearalenone detoxicated ability and study on its detoxification characterization and application[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021 (in Chinese).
- [7] ABD ALLA ES. Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals[J]. *Nahrung*, 1997, 41(6): 362-365.
- [8] PRAPAPANPONG J, UDOMKUSONSRI P, MAHAVORASIRIKUL W, CHOOCHUAY S, TANSAKUL N. *In vitro* studies on gastrointestinal monogastric and avian models to evaluate the binding efficacy of mycotoxin adsorbents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2019: 1.
- [9] PENG W, KO TP, YANG YY, ZHENG YY, CHEN CC, ZHU Z, HUANG CH, ZENG YF, HUANG JW, WANG AHJ, LIU JR, GUO RT. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(107): 62321-62325.
- [10] VIEILLE C, ZEIKUS GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(1): 1-43.
- [11] TAKAHASHI-ANDO N, OHSATO S, SHIBATA T, HAMAMOTO H, YAMAGUCHI I, KIMURA M. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(6): 3239-3245.
- [12] CUI YL, CHEN YC, LIU XY, DONG SJ, TIAN YE, QIAO YX, MITRA R, HAN J, LI CL, HAN X, LIU WD, CHEN Q, WEI WQ, WANG X, DU WB, TANG SY, XIANG H, LIU HY, LIANG Y, HOUK KN, et al. Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy[J]. *ACS Catalysis*, 2021, 11(3): 1340-1350.
- [13] HEINEMANN PM, ARMBRUSTER D, HAUER B. Active-site loop variations adjust activity and selectivity of the cumene dioxygenase[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1095.
- [14] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL SE, GERTMAN O, LAURINO P, ASHANI Y, DYM O, UNGER T, ALBECK S, PRILUSKY J, LIEBERMAN RL, AHARONI A, SILMAN I, SUSSMAN JL, TAWFIK DS, FLEISHMAN SJ. Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(2): 337-346.
- [15] GUEROIS R, NIELSEN JE, SERRANO L. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1 000 mutations[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(2): 369-387.
- [16] DOMBKOWSKI AA, SULTANA KZ, CRAIG DB. Protein disulfide engineering[J]. *FEBS Letters*, 2014, 588(2): 206-212.
- [17] NESTL BM, HAUER B. Engineering of flexible loops in enzymes[J]. *ACS Catalysis*, 2014, 4(9): 3201-3211.
- [18] KHAN FI, LAN DM, DURRANI R, HUAN WQ, ZHAO ZX, WANG YH. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2017, 5: 16.
- [19] FENG XD, TANG H, HAN BJ, ZHANG L, LV B, LI C. Engineering the thermostability of β -glucuronidase from *Penicillium purpurogenum* Li-3 by loop transplant[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(23): 9955-9966.
- [20] ZHAO HM, ARNOLD FH. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1999, 12(1): 47-53.
- [21] DONG RZ, PAN S, PENG ZL, ZHANG Y, YANG JY. mTM-align: a server for fast protein structure database search and multiple protein structure alignment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W380-W386.
- [22] KELLOGG EH, LEAVER-FAY A, BAKER D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability[J]. *Proteins*, 2011, 79(3): 830-838.
- [23] ASHKENAZY H, ABADI S, MARTZ E, CHAY O, MAYROSE I, PUPKO T, BEN-TAL N. ConSurf 2016:

- an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W344-W350.
- [24] ASHKENAZY H, EREZ E, MARTZ E, PUPKO T, BEN-TAL N. ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(suppl_2): W529-W533.
- [25] LANDAU M, MAYROSE I, ROSENBERG Y, GLASER F, MARTZ E, PUPKO T, BEN-TAL N. ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl_2): W299-W302.
- [26] CELNIKER G, NIMROD G, ASHKENAZY H, GLASER F, MARTZ E, MAYROSE I, PUPKO T, BEN-TAL N. ConSurf: using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function[J]. *Israel Journal of Chemistry*, 2013, 53(3/4): 199-206.
- [27] GLASER F, PUPKO T, PAZ I, BELL RE, BECHOR-SHENTAL D, MARTZ E, BEN-TAL N. ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information[J]. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2003, 19(1): 163-164.
- [28] LINDORFF-LARSEN K, PIANA S, PALMO K, MARAGAKIS P, KLEPEIS JL, DROR RO, SHAW DE. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2010, 78(8): 1950-1958.
- [29] JORGENSEN WL, CHANDRASEKHAR J, MADURA JD, IMPEY RW, KLEIN ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1983, 79(2): 926-935.
- [30] BUSSI G, DONADIO D, PARRINELLO M. Canonical sampling through velocity rescaling[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 2007, 126(1): 014101.
- [31] BERENDSEN HJC, POSTMA JPM, van GUNSTEREN WF, DiNOLA A, HAAK JR. Molecular dynamics with coupling to an external bath[J]. *The Journal of Chemical Physics*, 1984, 81(8): 3684-3690.
- [32] LUZAR A, CHANDLER D. Effect of environment on hydrogen bond dynamics in liquid water[J]. *Physical Review Letters*, 1996, 76(6): 928-931.
- [33] BARLOW DJ, THORNTON JM. Ion-pairs in proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1983, 168(4): 867-885.
- [34] 陈权, 吕成, 许菲. 基于柔性区域的计算设计改造玉米赤霉烯酮水解酶热稳定性[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(12): 4415-4429.
- CHEN Q, (LÜ/LV/LU/LYU) C, XU F. Computation-aided design of the flexible region of zearalenone hydrolase improves its thermal stability[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(12): 4415-4429 (in Chinese).
- [35] ELISA FERRANDI E, SAYER C, de ROSE SA, GUAZZELLI E, MARCHESI C, SANEEI V, ISUPOV MN, LITTLECHILD JA, MONTI D. New thermophilic $\alpha\beta$ class epoxide hydrolases found in metagenomes from hot environments[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2018, 6: 144.
- [36] SAYER C, ISUPOV MN, BONCH-OSMOLOVSKAYA E, LITTLECHILD JA. Structural studies of a thermophilic esterase from a new Planctomycetes species, *Thermogutta terrifontis*[J]. *FEBS Journal*, 2015, 282(15): 2846-2857.
- [37] SAYER C, FINNIGAN W, ISUPOV MN, LEVISSON M, KENGEN SWM, van der OOST J, HARMER NJ, LITTLECHILD JA. Structural and biochemical characterisation of *Archaeoglobus fulgidus* esterase reveals a bound CoA molecule in the vicinity of the active site[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25542.
- [38] HOTTA Y, EZAKI S, ATOMI H, IMANAKA T. Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3925-3931.
- [39] HUI RJ, HU XY, LIU WT, LIU WD, ZHENG YY, CHEN Y, GUO RT, JIN J, CHEN CC. Characterization and crystal structure of a novel zearalenone hydrolase from *Cladophialophora bantiana*[J]. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 2017, 73(9): 515-519.
- [40] CARUGO O, PONGOR S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures[J]. *Protein Science*, 2008, 10(7): 1470-1473.
- [41] YU HR, DALBY PA. Exploiting correlated molecular-dynamics networks to counteract enzyme activity-stability trade-off[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(52): E12192-E12200.

(本文责编 郝丽芳)