



李越,池慧兵,牛家峰,等. 基于定向进化技术提高呕吐毒素解毒酶 DepA 的催化活性[J]. 南京农业大学学报,2024,47(4):750-759.

LI Yue,CHI Huibing,NIU Jiafeng,et al. Enhanced catalytic activity of deoxynivalenol-degrading enzyme DepA by directed evolution[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(4):750-759.

## 基于定向进化技术提高呕吐毒素解毒酶 DepA 的催化活性

李越,池慧兵,牛家峰,马斌,周慧敏,朱萍,吕凤霞\*

(南京农业大学食品科学技术学院,江苏 南京 210095)

**摘要:**[目的]呕吐毒素(deoxynivalenol,DON)C3位羟基的异构化是生物脱毒的关键部位,其中 DepA 作为 DON 生物转化中第一步关键限速酶,存在催化活性低的问题,限制了其在食品及饲料加工领域中的应用。本文旨在通过定向进化技术对 DepA 进行分子改造,以期获得催化活性显著提高的突变酶,提高其工业化应用的潜力。[方法]通过易错 PCR 和 DNA shuffling 相结合的方法,构建突变文库,经高通量筛选后,对催化活性明显提高的突变体进行酶学性质表征。同时,采用分子动力学模拟和三维结构模拟分析,探究突变酶催化活性提高的分子机制。[结果]成功筛选到突变酶 S2、S10 和 S12,与野生型相比,其比活力分别提高 207%、293% 和 258%。动力学参数结果显示,突变酶 S2、S10 和 S12 的  $K_m$  值分别为 56.89、27.00 和 40.65  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,是野生型的 91.7%、43.5% 和 65.5%; $k_{\text{cat}}/K_m$  值分别为 327.30、576.67 和 380.07  $\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ,是野生型的 1.25、2.20 和 1.45 倍,相比野生型,突变酶亲和力和催化效率均显著提高。此外,分子动力学模拟和三维结构模拟分析结果表明,柔性增加、底物 DON 的进攻距离缩短、氢键增加、疏水性增加和远端效应是导致其催化活性提高的主要原因。[结论]本研究通过易错 PCR 和 DNA shuffling 相结合的定向进化策略有效提高了呕吐毒素解毒酶 DepA 的催化活性,为其工业化应用提供试验依据。

**关键词:**呕吐毒素解毒酶;定向进化;催化活性;分子动力学模拟

中图分类号:TS201.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0750-10

## Enhanced catalytic activity of deoxynivalenol-degrading enzyme DepA by directed evolution

LI Yue, CHI Huibing, NIU Jiafeng, MA Bin, ZHOU Huimin, ZHU Ping, LÜ Fengxia\*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**[Objectives] Deoxynivalenol(DON) can be biotoxified by hydroxyl isomerization at the C3 position. DepA, a rate-limiting enzyme, plays a critical role in the initial step of DON biotransformation; however, its low enzymatic activity restricts its potential for food and feed processing industrial application. To enhance its catalytic activity and improve its application potential, a directed evolution approach to molecularly alter DepA and obtain mutants with highly improved activity was utilized. [Methods] The mutant library was created using a mixture of error-prone PCR and DNA shuffling. After high-throughput screening, mutants with significantly increased enzyme activity were described in terms of their enzymatic properties. Additionally, molecular dynamics simulations and three-dimensional structure simulations were conducted in order to study the molecular mechanism behind the improved catalytic activity of the mutant enzymes. [Results] The mutant enzymes S2, S10 and S12 were successfully screened, which increased the specific activity by 207%, 293% and 258% compared with the wild type. The kinetic parameters results displayed that the  $K_m$  values of mutant enzymes S2, S10 and S12 were 56.89, 27.00 and 40.65  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, which depicted 91.7%, 43.5% and 65.5% of the wild type, respectively, while the  $k_{\text{cat}}/K_m$  values were 327.30, 576.67 and 380.07  $\text{L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , which were 1.25, 2.20 and 1.45 folds higher than those of the wild type, and affinity and catalytic efficiency of the mutant enzyme were significantly improved compared with the wild type. Meanwhile, the results of molecular dynamics simulations and three-dimensional structure simulations showed that the increased flexibility, shorter distance of the substrate DON and Asp304, increased hydrogen bond, increased hydrophobicity and distal effects were the primary factors contributing to the increased enzymatic activity. [Conclusions] The current investigation successfully enhanced the catalytic activity of deoxynivalenol-degrading enzyme DepA by employing a directed evolution strategy with error-prone PCR and DNA shuffling, thus forming a foundation for potential industrial application.

**Keywords:** deoxynivalenol-degrading enzyme; directed evolution; catalytic activity; molecular dynamics simulations

收稿日期:2023-06-09

基金项目:国家自然科学基金项目(32272267)

\*通信作者:吕凤霞,教授,研究方向为食品微生物与生物技术, E-mail: lufengxia@njau.edu.cn.

单端孢霉烯族毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),俗称呕吐毒素,是一种广泛存在于小麦、大麦和玉米等禾谷类作物的真菌毒素<sup>[1-5]</sup>,具有细胞毒性、神经毒性和免疫毒性等,对人和动物的健康构成重大威胁<sup>[6]</sup>。因此,呕吐毒素的污染和预防已成为食品加工及食品安全领域研究的热点<sup>[4,7]</sup>。

目前,呕吐毒素的生物降解方法备受关注,可以通过生物转化实现脱毒<sup>[8-9]</sup>。其中,德沃斯氏菌(*Devosia* sp.)来源的吡咯喹啉醌(PQQ)依赖性的醇脱氢酶 DepA (EC 1.1.1.5)能氧化 DON 的 C3 位羟基生成 3-酮基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-keto-DON),再经过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)依赖性醛酮还原酶 DepB/AKR13B2/AKR6D1 将 3-keto-DON 还原,生成无毒的 3-异构-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-epi-DON),即 C3 位的异构化<sup>[10-12]</sup>,这是目前阐述最为详细的 DON 生物转化途径。其中,DepA 作为 DON 生物转化中第一步关键限速酶,存在催化活性低的问题,限制了其在食品加工及饲料加工领域中的应用。蛋白质工程策略如定向进化(非理性设计)、半理性设计、理性设计、人工智能等,可以改善天然酶的性能,提高酶的工业属性<sup>[13-15]</sup>。定向进化属于蛋白质的非理性设计,不需要事先了解蛋白质的结构与功能,可快速构建突变体文库,通过高通量筛选有效实现酶性能的改善<sup>[16-19]</sup>。由于定向进化具有引入随机突变的特性,使其可以广泛用于酶的多种催化特性的改善,如催化活力、底物特异性和热稳定性等。Ruan 等<sup>[20]</sup>通过易错 PCR 对来自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) R-53 的麦芽糖淀粉酶(EC 3.2.1.133)进行定向进化提升催化活性,突变体 V296F/K415I 的比活力提高至野生型的 2.16 倍。曾静等<sup>[21]</sup>通过 2 轮易错 PCR 实现源于 *Thermococcus kodakarensis* 的普鲁兰多糖 III 型水解酶(EC 3.2.1.14)的定向进化,突变体 L538D 对可溶性淀粉和普鲁兰多糖比活力分别提高了 50% 和 21%,且可溶性淀粉、支链淀粉、麦芽三糖和异潘糖的  $k_{cat}/K_m$  值分别提高了 44%、27%、84% 和 37%。目前,有关醇脱氢酶分子改造方面的研究甚少,Zhu 等<sup>[22]</sup>通过易错 PCR 筛选得到一个热稳定性和催化效率都显著提高的 *Leifsonia* 醇脱氢酶突变酶 T100R/S148L,并通过解析野生型酶和突变酶的晶体结构,揭示了 100 位和 148 位残基在提高酶催化效率与热稳定性方面的关键作用。然而,国内外尚未见有关呕吐毒素解毒酶分子改造的研究报道。

本实验室前期研究发现,来源于德沃斯氏菌的呕吐毒素解毒酶 DepA 的催化活性较低。为提高 DepA 的催化活性,本研究采用易错 PCR 技术和 DNA shuffling 技术相结合的方法,对 DepA 进行定向进化,以期获得催化活性显著提高的突变体,并通过分子动力学模拟和三维结构模拟分析,探究突变体酶催化活性提高的分子机制,为其他呕吐毒素解毒酶的分子改造提供试验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与试剂

编码 DepA 的 DNA 序列(GenBank:KFL25551.1)经过密码子优化后由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。表达载体 pET-28a(+),质粒 pET-28a(+)/DepA 和表达宿主 *Escherichia coli* BL21(DE3)均由南京农业大学酶工程实验室保藏。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

限制性核酸内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 购于南京赛默飞实验器材公司;2×*Taq* Mix、ClonExpress II One Step Cloning Kit 重组酶、质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购于南京诺唯赞生物科技公司;卡那霉素(Kan)和异丙基-β-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)购于北京索莱宝公司;其他试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 仪器与设备

JY98-III 超声波细胞粉碎机购于宁波新芝科学仪器研究所;Centrifuge 5804R 冷冻离心机购于德国 Eppendorf 公司;UV-2450 紫外分光光度计购于日本岛津公司;PTC-100 PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司;Pow Pac HC164-5052 高电流电泳仪购于美国 Bio-Rad 公司;JS-380C 全自动数码凝胶成像仪购于上海培清科技有限公司。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 易错 PCR 突变文库构建** 以 pET-28a(+)/DepA 重组质粒为模板,设计含有 *Nde* I 酶切位点(下划线)的上游引物(5'-AGCCATATGCACGCGGATGGTGC GGCGGC-3')和含有 *Bam*H I 酶切位点(下划线)的下游引物(5'-TCGGATCCTTATTTTCGCTTCCGGCAGCGCG-3'),在普通 PCR 反应体系中加入一定浓度的 dNTP、Mg<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 进行易错随机诱变。易错 PCR 诱变体系:1.0 mmol·L<sup>-1</sup> dCTP, 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> dTTP, 上、下游引物各 2.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, 2×*Taq* PCR Mix 25.0 μL, 分别加入不同浓度(3、5、7 mmol·L<sup>-1</sup>) Mg<sup>2+</sup> 和不同浓度(0.4、0.5、0.6、0.7 mmol·L<sup>-1</sup>) Mn<sup>2+</sup>, 最后加入无菌 ddH<sub>2</sub>O 补足 50.0 μL。根据突变率来确定最

优的  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  组合浓度并进行后续随机诱变。易错 PCR 程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;72 °C 延伸 5 min。20  $g \cdot L^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物,再使用 DNA 凝胶回收试剂盒进行纯化。纯化的 PCR 产物用 *Nde* I 和 *Bam*H I 进行双酶切,酶切后回收目的片段与 pET-28a(+) 表达载体进行重组。将重组产物通过热激法转入表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,转接含 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  Kan 的 LB 平板,37 °C 过夜培养 12~16 h,获得随机诱变文库。

**1.3.2 DNA 改组(DNA shuffling)突变文库构建** 以易错 PCR 突变文库筛选获得催化活性最高的 3 个突变酶基因为模板,使用高保真聚合酶进行扩增。将亲本 DNA 片段等浓度混合并用 DNase I 进行随机片段化。消化条件:DNase I 酶 0.003 2 U $\cdot\mu L^{-1}$ ,37 °C 消化 10 min。消化完成后 95 °C 加热 10 min 终止反应。使用 20  $g \cdot L^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳验证,参考易错 PCR 纯化方法回收大小为 50~100 bp 的片段。将 50~100 bp 片段进行无引物 PCR 扩增,反应体系:25  $\mu L$  50~100 bp 胶回收片段,25  $\mu L$  2 $\times$ Taq PCR Mixture 缓冲液。无引物 PCR 扩增程序:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 90 s,40 个循环;72 °C 延伸 10 min。再以无引物 PCR 纯化产物作为模板,使用 1.3.1 节引物进行常规 PCR 反应扩增全长基因,产物纯化回收后酶连重组至 pET-28a(+) 表达载体,再转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3),构建突变文库。

**1.3.3 高通量筛选** 从 LB Kan 抗性平板上挑选单菌落,接种到 96 孔筛选板,每孔含有 600  $\mu L$  LB(含 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  Kan)培养基,以 DepA 野生型作为阳性对照。37 °C、200  $r \cdot min^{-1}$  培养 12 h 后,将 50  $\mu L$  菌液接种到另一含有 550  $\mu L$  LB(含 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  Kan)的 96 孔板中,37 °C、200  $r \cdot min^{-1}$  培养至  $D_{600}$  达 0.6,加入 IPTG 使其终质量浓度为 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ,16 °C、200  $r \cdot min^{-1}$  培养 16 h。离心收集菌体,每孔加入 200  $\mu L$  50  $mmol \cdot L^{-1}$  Tris-HCl(pH7.0)缓冲液,漩涡振荡使菌体充分重悬后置于-80 °C 冷冻、37 °C 融解。重复冻融 3 次,5 000  $r \cdot min^{-1}$  离心 10 min 后获得的上清液即为所需突变体的粗酶液。

通过 96 孔板高通量筛选获得催化活性提高的阳性突变体,对其进行摇瓶扩大培养,选取复筛活性提高的突变子进行测序。

**1.3.4 酶的表达和纯化** 将重组菌单菌落接种 LB 培养基(含 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  Kan),过夜培养 12~16 h,按照 1% 的接种量转接至 100 mL 培养基(含 50  $\mu g \cdot mL^{-1}$  Kan)中。培养至  $D_{600}$  达 0.6~0.8 时,加入 IPTG 使终浓度至 100  $\mu g \cdot mL^{-1}$ ,16 °C 诱导培养 16~20 h。离心收集菌体沉淀,弃上清液,用 50  $mmol \cdot L^{-1}$  PBS 缓冲液(pH7.0)使菌体充分重悬,使用超声破碎仪破碎细胞后再次离心,离心后得到的破碎上清液即为粗酶液。重组酶 DepA 含有 His 标签,使用镍柱亲和层析对野生型酶和突变体酶进行纯化。用 Bradford 法测定纯酶液蛋白质浓度,纯酶使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)验证和后续酶学性质研究。

**1.3.5 酶活性测定** 反应体系由 100  $\mu mol \cdot L^{-1}$  DON、250  $\mu mol \cdot L^{-1}$  2,6-二氯靛酚(DCIP)、50  $\mu mol \cdot L^{-1}$  5-甲基吩嗪硫酸甲酯(PMS)、100  $\mu mol \cdot L^{-1}$   $CaCl_2$ 、100  $\mu mol \cdot L^{-1}$  吡咯喹啉醌酸(PQQ)及 1.6  $\mu mol \cdot L^{-1}$  DepA 酶液组成,50  $mmol \cdot L^{-1}$  Tris-HCl(pH7.0)补齐体系至 300  $\mu L$ ,37 °C 反应 5 min,使用紫外-可见分光光度计记录反应液吸光值  $D_{600}$  变化。酶活性单位定义:在酶反应条件下,每分钟催化减少 1 nmol DCIP 的酶量为 1 个酶活性单位。酶活性计算公式:

$$\text{酶活性} = \frac{(\Delta D_{\text{test}} - \Delta D_{\text{blank}}) \times df \times V_t}{t_{\text{max}} \times k \times V_s},$$

式中: $\Delta D_{\text{test}}$  为酶液反应液吸光值; $\Delta D_{\text{blank}}$  为空白对照反应液吸光值; $df$  为稀释倍数; $V_t$  为反应液体积, $V_s$  为加入酶液体积; $t_{\text{max}}$  为最大反应时间; $k$  为显色剂 DCIP 的吸光系数。

**1.3.6 突变酶的酶学性质测定** 1) 酶的最适反应 pH 值及 pH 值稳定性。在 pH 值 5.0~10.0 时,用以下缓冲液检测 pH 值对 DepA 活性的影响:磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 值 5.0~7.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.0~9.0)、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 值 9.0~10.0)。以不同缓冲液测得的最高酶活性为 100%,计算相对酶活性;pH 值稳定性测定则将纯化酶在上述缓冲液中于 4 °C 条件下孵育 12 h,测定残余酶活性,以处理 0 h 的酶活性为 100%,计算残余酶活性。

2) 酶的最适反应温度及温度稳定性。最适反应温度测定:将酶液置于不同温度(25~50 °C)下进行酶促反应并测定酶活性,以不同温度下测得的最高酶活性为 100%,计算相对酶活性。温度稳定性(40 °C)测定:将酶液置于 40 °C 热处理 6 h,每间隔 1 h 取样测定酶活性和残余酶活性,以处理 0 h 酶活性为 100%,计算残余酶活性。

3) 酶动力学参数的测定。测定底物浓度在 5~500 mmol·L<sup>-1</sup> 的反应初速度,在 pH7.0、37 °C 下测定纯化酶活性,采用 Lineweaver-Burk 法,以底物浓度的倒数为横坐标 (1/[S]), 反应速率的倒数为纵坐标 (1/[v]), 在 Origin 9.0 软件中进行拟合,以确定 DepA 野生型酶及突变酶的米氏常数  $K_m$  和催化常数  $k_{cat}$  值。

**1.3.7 分子动力学模拟分析** 将原始野生型蛋白文件与突变酶蛋白文件使用 AutoDock 4.2<sup>[23-24]</sup> 软件与辅酶 PQQ 及底物 DON 进行对接,获得分子动力学模拟需要的模型。利用分子动力学模拟软件 Desmond 2021.1<sup>[25]</sup>,对野生型酶和突变酶 S2\_PQQ\_DON、S10\_PQQ\_DON、S12\_PQQ\_DON 复合物进行加氢,补齐反应需要的 2 个钙离子,使用 opl 力场构建蛋白酶和配体的参数文件,将复合物放进一个 1 nm×1 nm×1 nm 的立方体盒子并填充水分子,简单点电荷 (simple point charge, SPC) 模式处理水分子,为了使野生型酶及突变酶复合物保持电中性,体系中加入适量抗衡离子和 150 mmol·L<sup>-1</sup> 钠离子以达到模拟体系中渗透压环境。采用最陡下降法使体系能量最小化,随后进行 100 ps 的 NVT 平衡和 NPT 平衡,在恒温 310.15 K 下,温度耦合时间常数设置为 0.1 ps,压力耦合时间常数设置为 2.0 ps,压力耦合的压力设置为 1 bar,恒温恒压下进行 20 000 ps 的分子动力学模拟。采用 Origin 2023 软件分析均方根偏差 (root mean squared deviation, RMSD)、均方根涨落 (root mean squared fluctuation, RMSF) 及进攻距离 (distance)。

**1.3.8 三维结构模拟分析** 利用 PyMOL 2.4 软件分析突变前、后野生型及突变酶在关键氨基酸处的结构差异和底物与突变酶之间相互作用力变化。

#### 1.4 数据处理与统计分析

本文中所有酶活性及蛋白浓度测定均设置 3 个平行试验,结果用平均数±标准差表示。显著性分析采用 SPSS 17.0 软件的单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的 Tukey's 检验 ( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 易错 PCR 突变文库的高通量筛选

易错 PCR 的反应体系: 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> dCTP、1.0 mmol·L<sup>-1</sup> dTTP、3.00 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>、0.40 mmol·L<sup>-1</sup> Mn<sup>2+</sup>, 进行 2 轮易错 PCR, 从 14 000 余个转化子中筛选到 6 株酶活性提高的突变体。由表 1 可知: 突变体 2-5G 酶活性为 (322.79±18.05) U·mL<sup>-1</sup>, 是野生型的 2.86 倍。该突变体共发生 4 个位置碱基突变, 分别为 G117T、T758C、A772T 和 A1048C, 其中 G117T 为无义突变, 其他 3 个碱基突变引起的氨基酸变化分别为 L253P、S258C 和 K350Q。根据其突变位点的差异及酶活性参数, 选择突变体 2-6B、2-7D 和 2-5G 作为模板进行 DNA shuffling。

表 1 易错 PCR 获得的突变体催化活性及氨基酸变化

Table 1 Amino acid changes and activities of mutants generated from error-prone PCR

酶 Enzyme	酶活性/(U·mL <sup>-1</sup> ) Activities	提高倍数 Enhanced folds	碱基变化 Base changes	氨基酸变化 Amino acid changes
野生型 Wild type(WT)	112.83±6.56 <sup>d</sup>	1.00		
2-6B	257.15±11.56 <sup>b</sup>	2.28	C23T/A526G/C1615T/T1676C/A1460G/G222C	S176G/V559A/Y487C
2-7D	244.47±14.30 <sup>b</sup>	2.17	T215C/G818T/A949T/A1194G/T1218C	M72T/G273C/T317S
突变体 2-5G	322.79±18.05 <sup>a</sup>	2.86	G117T/T758C/A772T/A1048C	L253P/S258C/K349Q
Mutants 2-9F	182.67±12.63 <sup>c</sup>	1.62	T87C/A641C/A1199G	N214T/Y400C
2-8H	191.36±11.06 <sup>c</sup>	1.70	C248T/A668G/T1275A	A83V/E223G
2-11C	212.57±12.78 <sup>c</sup>	1.88	A137T/G997C/T1517G	Q46L/A333P/M506R

注: 同列数据不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。下同。

Note: Different letters in the same row mean significant difference at 0.05 level. The same as follows.

### 2.2 DNA shuffling 突变文库的高通量筛选

以突变体 2-6B、2-7D 和 2-5G 作为模板进行 DNA shuffling, 从 3 600 多个转化子中筛选出 5 株酶活性显著提高的突变体。由表 2 可知: 突变体 S12 的酶活性为 (458.01±4.57) U·mL<sup>-1</sup>, 是野生型的 3.57 倍, 引起的氨基酸变化为 G221V、D252V、G273C、T317S 和 K349Q。根据酶活性提高倍数, 选择突变酶 S2、S10 及 S12 进行分离纯化及酶学性质测定。

### 2.3 突变酶的酶学性质研究

**2.3.1 突变酶的 SDS-PAGE 电泳验证** 对经 2 轮易错 PCR 和 1 轮 DNA shuffling 获得的突变体 S2、S10 和 S12 进行发酵表达及分离纯化, 对纯化后突变酶进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 1。突变酶与野生型的

相对分子质量大小一致,蛋白条带约为  $62 \times 10^3$ , 与理论值相符。

表 2 DNA shuffling 突变酶的酶活性及氨基酸突变

Table 2 Amino acid changes and activities of mutant enzymes generated from DNA shuffling

酶 Enzyme	酶活性/(U·mL <sup>-1</sup> ) Enzyme activities	提高倍数 Enhanced folds	碱基变化 Base changes	氨基酸变化 Amino acid changes	
WT	127.99±1.45 <sup>d</sup>	1.00			
S2	330.62±14.28 <sup>b</sup>	2.58	C23T/G117T/C228T/A526G/G1569A/C1615T/T1676C	S175G/V559A/R539C	
S10	453.87±0.06 <sup>a</sup>	3.54	A526G/T542G/G979A/T1676C	S175G/V559A/V181G	
突变体 Mutants	S12	458.01±4.57 <sup>a</sup>	3.57	C99T/G117T/A471G/G662T/T542G/C669T/A755T/ G818T/A949T/A1048C/A1050G/A1194G/ T1218C/C1242T	G221V/D252V/G273C/ T317S/K349Q
	S14	283.32±13.68 <sup>c</sup>	2.21	G117T/T215C/A949T	M72T/D252V/T317S
	S17	298.63±10.67 <sup>c</sup>	2.33	C23T/G818T/T1676C	G273C/V559A

**2.3.2 突变酶的最适反应 pH 值、温度及 pH 值、温度稳定性测定** 突变酶最适反应 pH 值的测定结果(图 2-A)显示,突变酶 S2、S10、S12 与野生型的最适反应 pH 相同,均为 pH6.0。突变酶的 pH 值稳定性测定结果(图 2-B)显示,突变酶 S2、S10、S12 与野生型均在 pH7.0 处残余酶活性最高,在 pH 值 6.0~7.0 时均保持 60% 以上的残余酶活。因此,突变未影响酶的最适反应 pH 值和 pH 值稳定性。

突变酶最适反应温度的测定结果(图 2-C)显示,突变酶 S2、S10、S12 与野生型的最适反应温度相同,均为 35 °C。突变酶的温度稳定性(40 °C)测定结果(图 2-D)显示,除突变酶 S10 保持着高于野生型的残余酶活性,在 40 °C 热处理 2 h 后仍保持 60% 以上的残余活性,突变酶 S2、S12 的热稳定性均比野生型酶差,说明突变对热稳定性有影响。

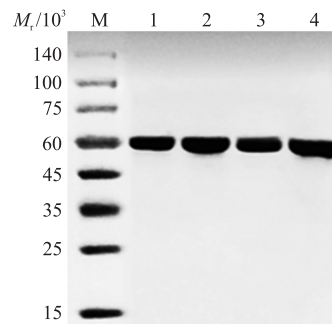


图 1 突变酶纯化后的 SDS-PAGE 验证

Fig. 1 SDS-PAGE verification of purified mutant enzymes

M: 标准蛋白 marker; 泳道 1: 野生型 DepA; 泳道 2: 突变酶 S2; 泳道 3: 突变酶 S10; 泳道 4: 突变酶 S12。

M: Standard protein marker; Lane 1: Wild type DepA; Lane 2: Mutant enzyme S2; Lane 3: Mutant enzyme S10; Lane 4: Mutant enzyme S12.

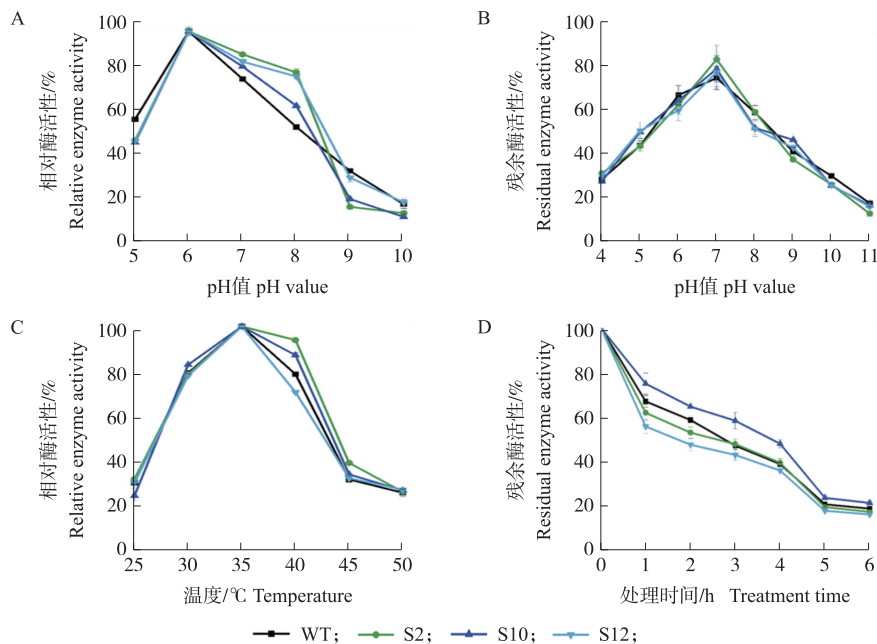


图 2 突变酶的酶学性质研究

Fig. 2 The enzymatic properties of mutant enzymes

A. 最适反应 pH 值 Optimal reaction pH value; B. pH 值稳定性 pH value stability; C. 最适反应温度 Optimal reaction temperature; D. 温度稳定性(40 °C) Thermostability(40 °C).

**2.3.3 突变酶动力学参数的测定** 突变酶的酶学动力学参数测定结果见表 3。突变酶 S2、S10 和 S12 的比活力分别为  $(2\ 503.33 \pm 32.15) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(3\ 211.67 \pm 154.95) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $(2\ 921.67 \pm 118.46) \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 是野生型的 3.07、3.93 和 3.58 倍。突变酶 S2、S10 和 S12 的  $K_m$  值分别为  $56.89$ 、 $27.00$ 、 $40.65 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 是野生型的 91.7%、43.5% 和 65.5%, 均低于野生型, 其  $K_m$  值降低, 表明酶与底物 DON 的亲合力提高; 突变酶 S2、S10 和 S12 的  $k_{\text{cat}}/K_m$  值分别为  $327.30$ 、 $576.67$  和  $380.07 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 是野生型的 1.25、2.20 和 1.45 倍, 催化效率的提高使突变酶比活力也提高。

表 3 突变酶比活力及动力学参数

Table 3 Specific activity and kinetic constants of mutant enzymes

酶 Enzyme	比活力/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ Specific activities	$K_m/$ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/\text{s}^{-1}$	$k_{\text{cat}}/K_m$ $(\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
WT	$816.67 \pm 20.21^{\text{d}}$	$62.02^{\text{a}}$	$16.21^{\text{b}}$	$261.37^{\text{d}}$
突变体 Mutants	S2 $2\ 503.33 \pm 32.15^{\text{c}}$	$56.89^{\text{b}}$	$18.62^{\text{a}}$	$327.30^{\text{c}}$
S10	$3\ 211.67 \pm 154.95^{\text{a}}$	$27.00^{\text{d}}$	$15.57^{\text{c}}$	$576.67^{\text{a}}$
S12	$2\ 921.67 \pm 118.46^{\text{b}}$	$40.65^{\text{c}}$	$15.45^{\text{c}}$	$380.07^{\text{b}}$

## 2.4 突变酶催化活性提高的分子机制

**2.4.1 分子动力学模拟** 如图 3-A 所示:野生型在 8 ns 达到平衡, RMSD 值为  $2.25 \text{ \AA}$ ; 而突变酶 S2、S10 和 S12 的平衡时间均后移, 分别在 10、13 和 13 ns 达到平衡; 此外, 与野生型相比, 突变酶 S2、S10 和 S12 的 RMSD 分别升高至  $2.75$ 、 $3.60$  和  $3.20 \text{ \AA}$ , RMSD 的后移和连续增加表明突变酶构象的灵活性增加<sup>[26]</sup>。比活力测定结果(表 3)显示, 突变酶 S2、S10 和 S12 的比活力分别是野生型的 3.07、3.93 和 3.58 倍, 与 RMSD 的变化结果一致, 说明突变酶的柔性增加, 使得催化活性提高。

如图 3-B 所示:在突变酶 S2、S10、S12 中,  $^{526}\text{ISGY} \cdots \text{GTGF}^{553}$  氨基酸残基运动的自由度比野生型更高。其中, 突变酶 S2 在 Thr531 和 Ser548 处以及突变酶 S10 和 S12 在 Gln539 和 Val541 处的 RMSF 值相比野生型明显上升, 说明上述位点运动自由度高。 $^{526}\text{ISGY} \cdots \text{GTGF}^{553}$  位于 DepA 的活性位点附近, 对 DepA 的催化活性影响很大, 当  $^{526}\text{ISGY} \cdots \text{GTGF}^{553}$  区域的自由度增加, 辅酶 PQQ 和底物 DON 更容易进入 DepA 的活性口袋, 使突变酶催化活性提高<sup>[27]</sup>。

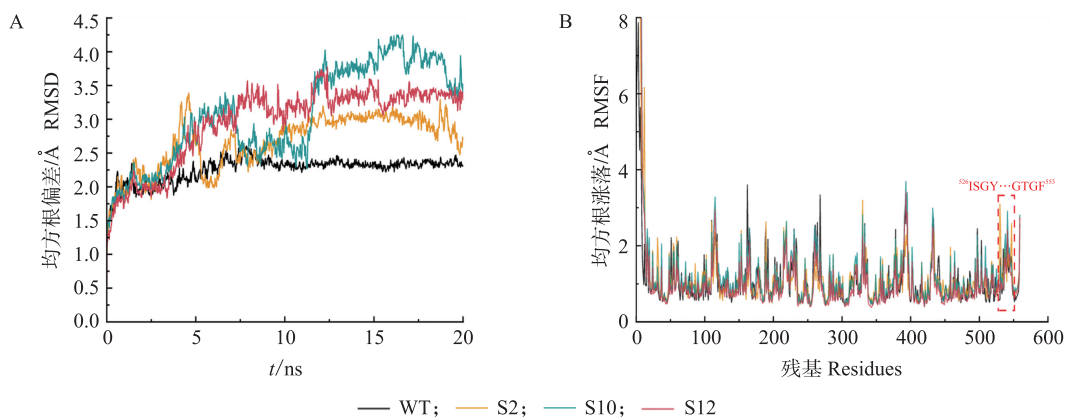


图 3 突变酶的均方根偏差 (RMSD, A) 和均方根涨落 (RMSF, B)

Fig. 3 Root mean squared deviation (RMSD, A) and root mean squared fluctuation (RMSF, B) of mutant enzymes

在 DepA 催化 DON 解毒的过程中, 活性位点 Asp304 在质子传递中发挥关键作用, 是与酸碱催化的质子反应中一个重要的催化碱基<sup>[28]</sup>。因此, 研究 Asp304 与底物 DON C3 位羟基的距离即底物 DON 的亲核进攻距离可反映酶与底物之间结合的能力<sup>[29]</sup>。野生型和突变酶的底物 DON 的亲核进攻距离分析结果见图 4。在野生型中, Asp304 与底物 DON C3 位羟基的距离稳定在  $5.6 \text{ \AA}$  附近, 而突变酶 S2 的底物进攻距离约为  $4.5 \text{ \AA}$ , 突变酶 S10 中的底物进攻距离稳定在  $3.7 \sim 4.3 \text{ \AA}$ , 突变酶 S12 的底物进攻距离稳定在  $3.2 \sim 4.3 \text{ \AA}$ , 表明在 DON 发生催化反应时, 突变酶 S2、S10 和 S12 反应体系中的底物进攻距离均比野生型的小, 因此, 更容易发生催化反应。突变酶的酶学动力学参数(表 3)显示, 突变酶 S2、S10 和 S12 的  $K_m$  分别是野生型的 91.72%、43.53% 和 65.54%, 与进攻距离变化趋势相符, 说明突变酶与底物的亲合力增加, 使得催化活性提高。

**2.4.2 突变酶的三维结构模拟分析** 为进一步探究突变酶催化活性提高的分子机制,从结构上分析突变酶 S2、S10 和 S12 与野生型 DepA 的氨基酸残基 Asp304 与底物 DON C3 位羟基的距离。结果如图 5 所示:在野生型中,该氨基酸 Asp304 与底物 DON C3 位羟基的距离为 6.4 Å,而在突变酶 S2、S10 和 S12 中,该距离分别为缩短为 6.1、3.8 和 4.2 Å,这与分子动力学模拟的结果变化趋势一致(图 4),进一步证实了亲核进攻距离的缩短可促进底物亲和力的提高,是催化活性提高的主要原因。

通过分析底物与周围其他关键氨基酸之间相互作用力的变化,进一步分析催化活性提高的原因。对突变酶 S2 及 S10 进行结构分析发

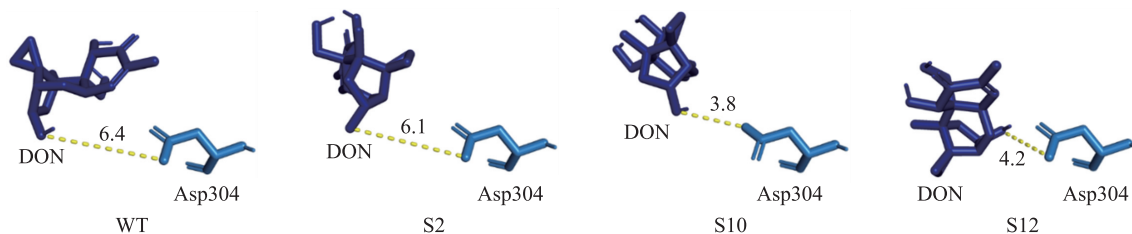


图 5 在 PyMol 模拟中 Asp304 与底物 DON C3 位羟基距离

Fig. 5 Distance between Asp304 and C3 hydroxyl group of the substrate DON during PyMol simulation

现,当位于活性中心附近的 175 位氨基酸由丝氨酸突变为甘氨酸后,氨基酸侧链变短,通道口袋增大,底物 DON 及产物 3-keto-DON 进出活性通道的空间位阻减小<sup>[30]</sup>。同时,S175G 中羟基的去除增加了活性中心的疏水性,从而提高了底物的转化效率<sup>[31]</sup>。此外,底物与 Phe405 之间的疏水作用消失,但是额外增加了底物与 Leu549 之间的疏水相互作用(图 6-A—C),疏水相互作用的增强使突变酶 S2 和 S10 可以更好结合底物,从而提高酶与底物的亲和力<sup>[32]</sup>。根据测得的动力学参数(表 3),S2 和 S10 的  $K_m$  分别是野生型的 91.72% 和 43.53%,亲和力较野生型得到提高。疏水作用的增强是突变酶 S2 和 S10 催化活性提高的原因之一。

对突变酶 S12 进行结构分析发现,当位于活性中心附近的 349 位氨基酸由赖氨酸突变为谷氨酰胺后,Gln349 与底物 DON 的距离缩短,额外形成了底物与 Gln349 的氢键作用。此外,底物与 Gln191 之间的氢键作用消失,但是额外增加了底物与 Tyr192 之间的氢键作用。同时,突变后,失去了底物和 Phe405 的疏水相互作用,额外增加了底物与 Leu124 和 Leu549 的疏水相互作用(图 6-D)。疏水氨基酸 Leu124、Leu406 和 Leu549 形成的疏水网络使底物 DON 及产物 3-keto-DON 更容易进出疏水通道,被锚定在活性中心。S12 的  $K_m$  是野生型

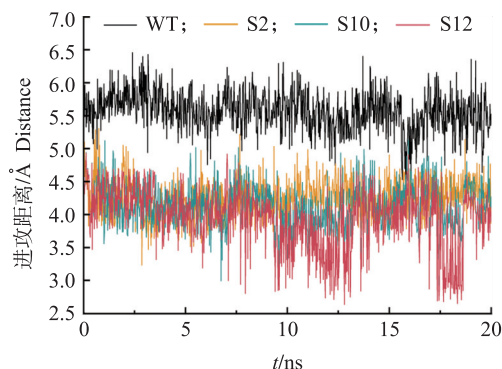


图 4 在 30 ns 分子动力学模拟中的氨基酸 Asp304 与底物 DON C3 羟基进攻距离

Fig. 4 Distance between the Asp304 and C3 hydroxyl group of the substrate DON for mutants during 30 ns molecular dynamics simulation

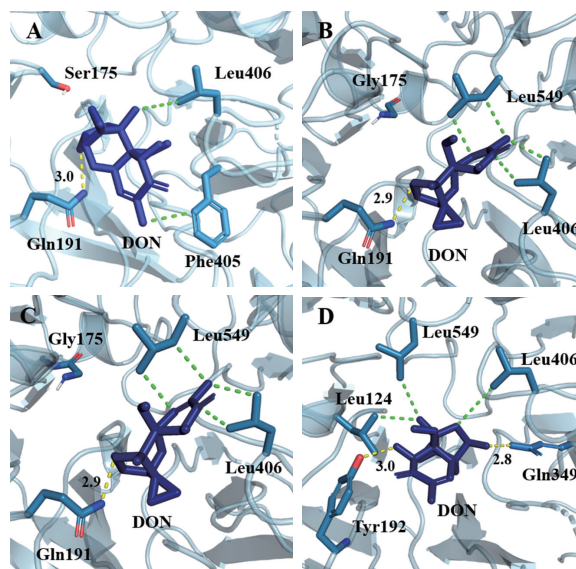


图 6 在 PyMol 模拟中野生型及突变酶的活性中心比较

Fig. 6 Active center comparison among wild type and mutant enzymes during PyMol simulation

A—D:野生型及突变酶 S2,S10 和 S12 Wild type and mutant enzymes S2,S10 and S12.

形成的氢键用黄色虚线表示,形成的疏水相互作用用绿色虚线表示。

The hydrogen bonds formed are shown by the yellow dashed line, and the hydrophobic interactions formed are shown by the green dashed line.

的 65.54%, 在发生突变后, 与底物的亲和力增加, 使其催化效率得到提高<sup>[33]</sup>。疏水作用和氢键的数量增加是突变酶 S12 催化活性提高的原因之一。

经结构分析发现, 突变酶 S2、S10 和 S12 中发生点突变的残基 V559A、R539C、V181G、G221V、D252V、G273C 和 T317S 距离活性中心超过 10 Å, 猜测是由于远端效应引起的催化活性提高。在酶催化的动态过程中, 蛋白构象的重新分布是调控底物结合机制和亚稳态构象的基础, 其中, 远端残基通过残基-残基网络与活性位点或蛋白中任何位置的残基相连, 影响蛋白的局部结构甚至导致整体异构<sup>[34]</sup>。同时, 远端突变远离活性中心并不直接改变底物结合口袋, 或许能够实现避免权衡并协同调节多个酶性能的目的<sup>[35-37]</sup>。远端效应也是提高突变酶 S2、S10 和 S12 催化活性的原因之一。

### 3 讨论与结论

酶在工业生产中被广泛应用, 其催化活性和热稳定性的提高对于实现工业化生产至关重要<sup>[38]</sup>。在蛋白质工程中, 理性设计、半理性设计及定向进化是改善酶催化性能的主要手段。然而, 理性设计和半理性设计要求深入了解结构和功能之间的关系, 限制了其广泛应用<sup>[39-40]</sup>。相比之下, 定向进化不受蛋白结构的限制, 通过引入高度随机的突变位点构建突变文库, 为提高酶的催化性能提供可能<sup>[17]</sup>, 因此是最理想的改善催化性能的酶工程策略之一。例如, Tang 等<sup>[41]</sup>通过 2 轮易错 PCR 对甲酸酯脱氢酶 CbFDH<sup>C23S</sup> (EC 1.17.1.10) 进行定向进化, 成功获得比母本活性高 4 倍的突变体 M2, 提高了其工业应用潜力。尽管醇脱氢酶的分子改造已有相关报道, 但关于呕吐毒素解毒酶的分子改造方面, 国内外尚未见有相关报道。本研究中, 针对呕吐毒素解毒酶 DepA 催化活性低的问题, 通过易错 PCR 和 DNA shuffling 相结合的方法对其进行改造, 最终筛选到催化活性显著提高的突变酶 S2、S10 和 S12。

提高催化活性最常见方法是通过活性中心的重塑和引入新的底物相互作用来实现<sup>[42]</sup>。Xu 等<sup>[43]</sup>采用易错 PCR 对色氨酸合酶 (EC 4.1.99.25) 进行分子改造, 成功使突变酶的催化活性提高了 3.79 倍。结构分析发现, 突变改变了活性中心大小及形状, 促进了突变酶的催化活性。另外, Clifton 等<sup>[44]</sup>通过交错延伸 (staggered extension process, StEP) 对环己二烯脱氢酶 (EC 4.2.1.91) 进行体外进化, 通过结构分析及分子动力学模拟发现突变引入的氢键网络促进了底物过渡态的稳定, 实现了催化活性的提高。研究表明, 突变酶的活性中心与底物的氢键作用及疏水相互作用增加, 使底物 DON 的结合及产物 3-keto-DON 的释放更易进行, 从而提高了酶的催化活性。此外, 分子动力学模拟中的底物亲核进攻距离也是评估催化性能的重要参数。李聪聪等<sup>[45]</sup>研究表明, 不同底物中内酯酶的 Tyr98 与底物的内酯环羰基碳及对氧磷的进攻距离越短, 底物与蛋白质的结合能力越强, 催化活性也越高。本研究结果进一步验证了底物进攻距离与催化活性成反比的关系, 突变酶的底物进攻距离缩短有助于提高其催化活性。因此, 本研究结合分子动力学模拟和三维结构模拟分析, 揭示了突变酶催化活性提高的分子机制, 为改良其他醇脱氢酶提供了有力依据。

除了活性中心的改造, 近年来, 随着计算机技术在蛋白质工程中的应用, 研究人员开始将注意力转向远离活性中心的位点。远端部位引入突变会带来二级结构的变化、三级结构的重塑、四级结构的重新排列以及表面净电荷和盐桥的改变, 这些突变一般不会对活性中心造成根本性改变, 这是一种较为温和的酶性能改造方法<sup>[34, 46]</sup>。Gu 等<sup>[35]</sup>利用定向进化对醇脱氢酶进行改造, 发现远离活性中心的突变体 L34A 和 L137V 在实现立体选择性偏好提高的同时也显著提高了催化活性, 这为传统以活性中心为重点的蛋白质工程提供了有效补充。本研究发现远端效应也影响 DepA 的催化活性, 该结果为提高酶的催化活性提供了新的研究思路<sup>[47]</sup>。

综上, 通过易错 PCR 和 DNA shuffling 相结合的方法, 本研究成功获得了酶活性显著提高的突变酶 S2、S10 和 S12, 其比活力比野生型分别提高了 207%、293% 和 258%。此外, 这些突变酶的底物亲和力和催化效率也显著提高。分子动力学模拟和三维结构模拟分析揭示, 突变引起柔性增加、底物 DON 的进攻距离缩短、氢键增加以及疏水性增强, 从而提高其酶的催化活性。本研究提示: 定向进化策略能有效提高呕吐毒素解毒酶 DepA 的催化活性, 为其工业应用提供了重要依据。

#### 参考文献 References:

- [1] Chen Y, Kistler H C, Ma Z H. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management[J]. Annual Review of Phytopathology, 2019, 57: 15-39.

- [2] Khaneghah A M, Martins L M, von Hertwig A M, et al. Deoxynivalenol and its masked forms: characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 71: 13–24.
- [3] Mishra S, Dixit S, Dwivedi P D, et al. Influence of temperature and pH on the degradation of deoxynivalenol (DON) in aqueous medium: comparative cytotoxicity of DON and degraded product[J]. Food Additives & Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2014, 31(1): 121–131.
- [4] Sumarah M W. The deoxynivalenol challenge[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(31): 9619–9624.
- [5] Jurasek L M, Kappenberg A, Amelung W. Mycotoxins in soil and environment[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 814: 152425.
- [6] Chlebicz A, Sliżewska K. *In vitro* detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub>, deoxynivalenol, fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2020, 12(1): 289–301.
- [7] Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, et al. Deoxynivalenol and its toxicity[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2010, 3(3): 94–99.
- [8] 罗会颖, 张宏海, 姚斌. 呕吐毒素生物降解机制研究进展[J]. 饲料工业, 2023, 44(9): 1–7.
- Luo H Y, Zhang H H, Yao B. Research progress of vomitoxin biodegradation mechanism[J]. Feed Industry, 2023, 44(9): 1–7 (in Chinese with English abstract).
- [9] 林如琴, 吴思婷, 余丹妮, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇脱毒方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(6): 90–99.
- Lin R Q, Wu S T, Yu D N, et al. Research progress on detoxification technology of deoxynivalenol[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(6): 90–99 (in Chinese with English abstract).
- [10] Carere J, Hassan Y I, Lepp D, et al. The identification of DepB: an enzyme responsible for the final detoxification step in the deoxynivalenol epimerization pathway in *Devosia mutans* 17-2-E-8[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1573.
- [11] Carere J, Hassan Y I, Lepp D, et al. The enzymatic detoxification of the mycotoxin deoxynivalenol: identification of DepA from the DON epimerization pathway[J]. Microbial Biotechnology, 2018, 11(6): 1106–1111.
- [12] He W J, Shi M M, Yang P, et al. A quinone-dependent dehydrogenase and two NADPH-dependent aldo/keto reductases detoxify deoxynivalenol in wheat via epimerization in a *Devosia* strain[J]. Food Chemistry, 2020, 321: 126703.
- [13] da Silva Amatto I V, da Rosa-Garzon N G, de Oliveira Simões F A, et al. Enzyme engineering and its industrial applications[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022, 69(2): 389–409.
- [14] 曲戈, 朱彤, 蒋迎迎, 等. 蛋白质工程: 从定向进化到计算设计[J]. 生物工程学报, 2019, 35(10): 1843–1856.
- Qu G, Zhu T, Jiang Y Y, et al. Protein engineering: from directed evolution to computational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2019, 35(10): 1843–1856 (in Chinese with English abstract).
- [15] 祁延萍, 朱晋, 张凯, 等. 定向进化在蛋白质工程中的应用研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(6): 1081–1108.
- Qi Y P, Zhu J, Zhang K, et al. Recent development of directed evolution in protein engineering[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(6): 1081–1108 (in Chinese with English abstract).
- [16] Lin-Goerke J L, Robbins D J, Burczak J D. PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration[J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 409–412.
- [17] Arnold F H. Engineering enzymes for non-aqueous solvents[J]. Trends in Biotechnology, 1990, 8(9): 244–249.
- [18] Cadwell R C, Joyce G F. Randomization of genes by PCR mutagenesis[J]. PCR Methods and Applications, 1992, 2(1): 28–33.
- [19] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 666–668.
- [20] Ruan Y Q, Zhang R Z, Xu Y. Directed evolution of maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* R-53: enhancing activity and thermostability improves bread quality and extends shelf life[J]. Food Chemistry, 2022, 381: 132222.
- [21] 曾静, 郭建军, 袁林. 易错 PCR 技术提高嗜热酸性 III 型普鲁兰水解酶 TK-PUL 催化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2022, 43(18): 130–136.
- Zeng J, Guo J J, Yuan L. Research on improving the catalytic activity of thermoacidophilic type III pullulan hydrolase TK-PUL by error-prone PCR[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(18): 130–136 (in Chinese with English abstract).
- [22] Zhu L, Song Y, Chang C C, et al. Engineering *Leifsonia* alcohol dehydrogenase for thermostability and catalytic efficiency by enhancing subunit interactions[J]. ChemBioChem, 2021, 22(22): 3178–3183.
- [23] Goodsell D S, Morris G M, Olson A J. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock[J]. Journal of Molecular Recognition, 1996, 9(1): 1–5.
- [24] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. Journal of Computational Chemistry, 2009, 30(16): 2785–2791.
- [25] Bowers K J, Sacerdoti F D, Salmon J K, et al. Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters[C]//Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing-SC'06. November 11–17, 2006. Tampa, Florida: ACM Press, 2006: 84.
- [26] Ahmad B, Saeed A, Castrosanto M A, et al. Identification of natural marine compounds as potential inhibitors of CDK2 using molecular docking and molecular dynamics simulation approach[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2023, 41(17): 8506–8516.
- [27] Wu K, Yang Z J, Meng X G, et al. Engineering an alcohol dehydrogenase with enhanced activity and stereoselectivity toward diaryl ketones: reduction of steric hindrance and change of the stereocontrol element[J]. Catalysis Science & Technology, 2020, 10(6): 1650–1660.
- [28] Yang H, Yan R X, Li Y, et al. Structure-function analysis of a quinone-dependent dehydrogenase capable of deoxynivalenol detoxification[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(22): 6764–6774.
- [29] Zhang S Y, Sun L Z, Dong L, et al. Targeted regulation of pulsed electric field (PEF) treatment on responsive amino acids based on the molecular

- dynamic simulation[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2022, 82: 103197.
- [30] Qiu S, Xu S Y, Li S F, et al. Fluorescence-based screening for engineered aldo-keto reductase KmAKR with improved catalytic performance and extended substrate scope[J]. *Biotechnology Journal*, 2021, 16(9): e2100130.
- [31] González-Duarte R A, Atrian S. Protein engineering of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. The hydroxyl group of Tyr<sup>152</sup> is involved in the active site of the enzyme[J]. *FEBS Letters*, 1992, 308(3): 235–239.
- [32] Creaser E H, Murali C, Britt K A. Protein engineering of alcohol dehydrogenases, effects of amino acid changes at positions 93 and 48 of yeast ADH1[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1990, 3(6): 523–526.
- [33] Sandholu A S, Mujawar S P, Ramakrishnan K, et al. Structural studies on 10-hydroxygeraniol dehydrogenase: a novel linear substrate-specific dehydrogenase from *Catharanthus roseus*[J]. *Proteins*, 2020, 88(9): 1197–1206.
- [34] Gu J, Xu Y, Nie Y. Role of distal sites in enzyme engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2023, 63: 108094.
- [35] Gu J, Sim B R, Li J R, et al. Evolutionary coupling-inspired engineering of alcohol dehydrogenase reveals the influence of distant sites on its catalytic efficiency for stereospecific synthesis of chiral alcohols[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 5864–5873.
- [36] Wang X Y, Zhang X B, Peng C, et al. D3DistalMutation: a database to explore the effect of distal mutations on enzyme activity[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2021, 61(5): 2499–2508.
- [37] Zhu J X, Wang J X, Han W W, et al. Neural relational inference to learn long-range allosteric interactions in proteins from molecular dynamics simulations[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1661.
- [38] Choi J M, Han S S, Kim H S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(7): 1443–1454.
- [39] Cukuroglu E, Engin H B, Gursoy A, et al. Hot spots in protein-protein interfaces: towards drug discovery[J]. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2014, 116(2/3): 165–173.
- [40] Erdemir A, Mutlu O. Functional and structural characterization of the pentapeptide insertion of *Theileria annulata* lactate dehydrogenase by site-directed mutagenesis, comparative modeling and molecular dynamics simulations[J]. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2017, 74: 344–351.
- [41] Tang C D, Zhang Z H, Shi H L, et al. Directed evolution of formate dehydrogenase and its application in the biosynthesis of *L*-phenylglycine from phenylglyoxylic acid[J]. *Molecular Catalysis*, 2021, 513: 111666.
- [42] Yang G, Miton C M, Tokuriki N. A mechanistic view of enzyme evolution[J]. *Protein Science*, 2020, 29(8): 1724–1747.
- [43] Xu L S, Li T T, Huo Z Y, et al. Directed evolution improves the enzymatic synthesis of *L*-5-hydroxytryptophan by an engineered tryptophan synthase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021, 193(10): 3407–3417.
- [44] Clifton B E, Kaczmarek J A, Carr P D, et al. Evolution of cyclohexadienyl dehydratase from an ancestral solute-binding protein[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14(6): 542–547.
- [45] 李聪聪, 刘明皓, 韩佳睿, 等. 基于分子动力学模拟的 VmoLac 非特异性底物催化活性的理论研究[J]. *高等学校化学学报*, 2021, 42(8): 2518–2528.
- Li C C, Liu M H, Han J R, et al. Theoretical study of the catalytic activity of VmoLac non-specific substrates based on molecular dynamics simulations[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2021, 42(8): 2518–2528 (in Chinese with English abstract).
- [46] Wang X X, Ma Q Y, Shen J, et al. Application fields, positions, and bioinformatic mining of non-active sites: a mini-review[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 661008.
- [47] Karamitros C S, Murray K, Winemiller B, et al. Leveraging intrinsic flexibility to engineer enhanced enzyme catalytic activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(23): e2118979119.

责任编辑: 范雪梅