

祖先序列重建增强D-阿洛酮糖3-差向异构酶的热稳定性

管立军, 朱玲, 王崑仑, 李家磊, 高扬, 严松, 张馨笛, 陈晴, 季妮娜, 李波

Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Thermal Stability of D-Allulose 3-Epimerase

GUAN Lijun, ZHU Ling, WANG Kunlun, LI Jialei, GAO Yang, YAN Song, ZHANG Xindi, CHEN Qing, JI Nina, and LI Bo

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024010227>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

D-阿洛酮糖3-差向异构酶在大肠杆菌内的高效可溶性表达及发酵条件研究

Efficient Soluble Expression and Fermentation Conditions of D-Allulose 3-Epimerase in *Escherichia coli*

食品工业科技. 2022, 43(22): 136-143 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021120208>

乙醇体系中D-阿洛酮糖的结晶工艺优化

Crystallization Process Optimization of D-psicose in Ethanol System

食品工业科技. 2019, 40(24): 185-189,198 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.24.030>

弱酸性D-来苏糖异构酶分子改造及D-甘露糖生产

Molecular Modification of D-lyxose Isomerase with Weak Acid Characteristic and D-mannose Production

食品工业科技. 2021, 42(17): 129-137 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021020066>

热稳定性高 β -甘露聚糖酶产生菌的筛选、鉴定及酶学性质研究

Isolation, Identification and Enzyme Properties of a β -Mannanase Producing Strain with High Thermal Stability

食品工业科技. 2020, 41(19): 127-131 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.020>

鲨鱼单域抗体-碱性磷酸酶融合蛋白的表达及热稳定性分析

Expression and Thermal Stability Analysis of Shark Single Domain Antibody-Alkaline Phosphatase Fusion Protein

食品工业科技. 2020, 41(21): 110-115 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020020051>

D-甘露糖生产工艺及生理功能研究进展

Research Progress on the Production Technology and Physiological Function of D-mannose

食品工业科技. 2022, 43(17): 458-465 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080363>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

管立军, 朱玲, 王崑仑, 等. 祖先序列重建增强 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的热稳定性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 121-128. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227

GUAN Lijun, ZHU Ling, WANG Kunlun, et al. Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Thermal Stability of D-Allulose 3-Epimerase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 121-128. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227

· 生物工程 ·

祖先序列重建增强 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的热稳定性

管立军^{1,2}, 朱玲^{1,2}, 王崑仑^{1,2}, 李家磊^{1,2}, 高扬^{1,2}, 严松^{1,2}, 张馨笛^{1,2}, 陈晴^{1,2}, 季妮娜³, 李波^{1,2,*}

(1. 黑龙江省农业科学院食品加工研究所, 黑龙江哈尔滨 150086;

2. 黑龙江省食品加工重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150086;

3. 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:为解决现有 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (DAEse) 热稳定性差的产业问题, 本文采用系统发育指导的大数据挖掘、合理修饰和祖先序列重建策略 (ASR), 重建了具有不同催化结构域 DAEse 的祖先序列, 构建了表达载体, 通过重组表达与分子对接筛选出了 DAEse A13 并进行酶学性质表征, 此外, 还基于结构分析与分子动力学模拟揭示了 DAEse A13 热稳定性增强的分子机制。结果表明, 基于 ASR 策略所构建的 A13 70 °C 时半衰期可达 8.4 h, 其热稳定性较野生 (WT) 酶显著增强, 最大转化率为 31%, 催化活性也略高于 WT 酶。立体结构模拟与分子动力学模拟揭示了 ASR A13 中大量氢键和疏水作用的增加维持了高温下酶分子结构的稳定性, 是其热稳定性增强的主要因素。研究结果证实了 ASR 策略可以改造 DAEse 使其稳定性、活性和混杂性增强, 可以为 D-阿洛酮糖工业生产提供良好的生物催化剂。

关键词:祖先序列重建, D-阿洛酮糖, D-阿洛酮糖 3-差向异构酶, 热稳定性

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)21-0121-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024010227

本文网刊:



Ancestral Sequence Reconstruction Enhances Thermal Stability of D-Allulose 3-Epimerase

GUAN Lijun^{1,2}, ZHU Ling^{1,2}, WANG Kunlun^{1,2}, LI Jialei^{1,2}, GAO Yang^{1,2}, YAN Song^{1,2}, ZHANG Xindi^{1,2}, CHEN Qing^{1,2}, JI Nina³, LI Bo^{1,2,*}

(1. Food Processing Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China;

2. Heilongjiang Province Key Laboratory of Food Processing, Harbin 150086, China;

3. Soybean Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: To solve the problem of poor thermal stability of the current D-allulose 3-epimerase (DAEse), the ancestor sequences of DAEse with different catalytic domains were reconstructed by big data mining, reasonable modification and ancestor sequence reconstruction (ASR) strategy under the guidance of phylogenetic information. The expression vectors of the ancestor sequences were constructed, and DAEse A13 with significantly enhanced thermal stability was screened by recombinant expression and molecular docking, and its enzymatic properties were characterized. In addition, the molecular mechanism of thermal stability enhancement of DAEse A13 was revealed based on structural analysis and molecular dynamics. The results showed that the half-life of A13 constructed based on ASR strategy could reach 8.4 h at 70 °C, indicating that its thermal stability was significantly enhanced compared with that of wild-type (WT) enzyme. The maximum conversion rate of A13 reached 31%, indicating that the catalytic activity of A13 was slightly higher than that of

收稿日期: 2024-01-24

基金项目: 黑龙江省省属科研院所科研业务费基础项目 (CZKYF2022-1-B021); 国家自然科学基金资助项目 (31600642)。

作者简介: 管立军 (1983-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品工程与营养, E-mail: qqaiiph@sina.com。

* 通信作者: 李波 (1980-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品工程与营养, E-mail: blnky@163.com。

WT enzyme. The structural and molecular dynamics analysis revealed that the increase in hydrogen bonding and hydrophobic interaction in ASR A13 was the main factor responsible for maintaining the stability of the enzyme's molecular structure at high temperatures. The results showed that ASR strategy could modify DAEases to enhance the stability, activity or hybridity, which could provide superior biocatalyst sources for various industrial applications of functional sugars.

Key words: ancestral sequence reconstruction; D-allulose; D-allulose 3-epimerase; thermostability

祖先序列重建技术 (Ancestral sequence reconstruction, ASR) 是一种允许从同源野生型基因的集合推断“祖先”基因的方法, 能够解析生物酶结构与功能关系的演化过程提供新思路^[1-3]。ASR 通过使用已有蛋白质序列的数据集进行多重序列比对来构建系统发育树, 基于精确的系统发育分析开发的算法来推断目标序列的祖先序列^[2,4]。ASR 产生的祖先生物酶通常具有更高的稳定性^[5] 或更广的底物谱^[6], 在一些情况下可以两者同时实现^[7-9]。Joho 等^[8] 成功应用 ASR 获得了热稳定性和催化活性显著提高的分解 PET 塑料的 PET 酶。Gumulya 等^[9] 通过 ASR 技术重建了底物谱扩大且稳定性显著增强的新型 P450 酶。与传统方式相比, ASR 具有多重优势, 包括突变的随机性足够大且远离活性位点^[10]、筛选范围更小^[11-13] 以及重构过程并不依赖目标酶的详细结构信息^[14-16]。目前, 尚未有将 ASR 应用于差向异构酶的改造的相关报道。

D-阿洛酮糖是一种公认安全的稀有糖, 其相对甜度可以达到蔗糖的 70%, 但热量仅为 0.2 kcal/g^[17-18]。此外, D-阿洛酮糖具有多种生理作用, 如抗肥胖、抗高血糖、抗糖尿病、抗氧化和神经保护作用^[19-21]。因此, D-阿洛酮糖在食品和医药等行业具有重要的应用价值^[22-23]。D-阿洛酮糖 3-差向异构酶 (DAEase) 是基于 Izumoring 策略由 D-果糖生物合成 D-阿洛酮糖的关键酶, 其催化最适温度为 55~65 °C^[24-26]。目前所报道的 DAEases 大多具有较高的底物特异性和催化活性, 但热稳定性较差, 无法在实际生产的工业条件下应用^[27]。Zhang 等^[28] 筛选了来源于 *Treponema primitia* ZAS-1 的 DAEase (TpDAE), 它在 70 °C 条件下催化 500 g/L D-果糖转化 D-阿洛酮糖的产率为 137.5 g/L, 转化率为 27.5%, 但孵育 1 h 后活性完全丧失。此外, 来源于 *Clostridium cellulolyticum* 的 DAEase 在 60 °C 条件下的半衰期仅为 10 min^[29], 来源于 *Christensenellaceae. minuta* 的 DAEase 在 50 °C 条件下半衰期为 40 min^[30]。因此, 获得高催化活性和热稳定性的 DAEase 是当前该领域的研究热点。

本研究基于具有较高催化活性的 TpDAE 蛋白序列开展祖先序列重建策略研究, 重建了具有不同催化结构域的祖先序列。此后, 通过基因合成获得了序列重建的 DAEase (A1 和 A13) 基因序列, 构建了重组表达质粒与大肠杆菌重组表达菌株, 对重建后的 DAEase 进行纯化与表征, 其中 A13 较野生 (WT) 酶

热稳定性显著增强。基于结构分析与分子动力学模拟实验探索了 DAEase 稳定性和催化活性增强的内在机制。以上研究表明, 祖先序列重建策略可以筛选出具有优良性能的差向异构酶, 能为具有新特性的稀有糖生物转化酶的半理性工程设计提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

Escherichia coli JM109、*Escherichia coli* BL21 (DE3)、pET22b(+) 均为实验室保存; Nde I、Xho I 大连宝生物 Takara 公司; 质粒小提试剂盒、小量 DNA 胶纯化回收试剂盒 Omega Bio-Tek 公司; Luria-Bertani (LB) 培养基; 准确称取酵母浸粉 5 g, 蛋白胨 10 g 和 NaCl 10 g, 溶于 1000 mL 蒸馏水中, 121 °C 高压灭菌 20 min; 所有化学品均为分析级均来自 Sigma-Aldric 公司或生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

HYG-II 型回旋式恒温调速摇床柜 上海欣蕊自动化设备有限公司; DYCZ-24D 型核酸电泳仪 北京市六一仪器厂; Agilent 1260 型高效液相色谱仪 上海莱睿科学仪器有限公司; Agilent 1260 Infinity 蒸发光散射检测器 安捷伦科技有限公司; 碳水化合物 ES 柱-w(5 μm, 4.6×250 mm) 赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的系统发育推断与祖先序列重建 本研究利用 FireProtASR (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotasr>) 进行系统发育推断和祖先序列重建。将 TpDAE 的氨基酸序列输入 FireProtASR 进行分析, FireProtASR 通过 SwissProt 和 Catalytic Site Atlas 对 DAEase 的氨基酸序列进行保守性评估, 其 Y6、E152、E158、D185、H211、R217 和 E246 催化残基选为保守区域。FireProtASR 首先利用 PSI-BLAST 对 NCBI 数据库的 DAEase 进行筛选以获取其同源性序列; 其次通过 ClustalΩ 对同源序列进行多序列比对并利用 IQTREE 软件包推断其系统发育树; 然后将多序列比对结果和建立的系统发育树输入 RAxML 算法进一步扩展其系统发育树; 最后将系统发育树和多序列比对结果导入到使用 Lazarus 方法的 PALM 软件包中以重建其祖先序列。FireprotASR 算法采用局部加权回归共识法处理误差, 其进行 50 次自举以验证系统进化树, 引导程序输出值的范围为 5~100, 大多数 ASR 节点的引

导值大于 70,表明节点的置信度较高。采用 Discovery Studio 2019 对重建的 ASR DAEase 进行分子对接实验。

1.2.2 A1 和 A13 的克隆过表达和蛋白纯化 祖先序列重建后的 DAEase 及其后代的编码基因由金唯智生物科技有限公司合成,插入 pET22b(+)载体的 Nde I 和 Xho I 限制性内切酶位点之间构建重组载体,测序验证后备用。将重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3)中,接种于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选阳性转化子。

从平板上挑取长势良好的阳性转化子接种至含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 200 mL LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 220 r/min 条件下培养。当菌体密度(OD_{600})达到 0.6~0.8 时,加入 0.2 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其蛋白表达。在 16 $^{\circ}\text{C}$ 110 r/min 下进一步培养 12 h,使 DAEase 缓慢表达。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 5000 r/min 条件下离心 15 min 收集菌体,用 0.85% 生理盐水洗涤两次。

细胞在 Lysis buffer(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT, pH7.5)中超声破碎 10 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 条件下离心 30 min 去除细胞碎片。将上清液与 Ni-NTA 树脂充分结合后加入重力柱,用 10 mL Lysis buffer 和 Elution buffer(50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl 和 1 mmol/L DTT, pH7.5)分别洗涤,Elution buffer 洗脱后的流通液即为 His 标记的重组蛋白溶液。利用 SDS-PAGE 检验蛋白表达及纯化效果,并通过 Nanodrop 2000 测定纯化后的蛋白浓度,用于后续活性测定。

1.2.3 A13 性质的表征 在 40~80 $^{\circ}\text{C}$ 下反应确定温度对祖先序列重建后 DAEase A13 活性的影响。**pH 稳定性:** 在不同缓冲液(MES: pH5.5~7.0, PBS: 7.0~8.0, Tris-HCl: 8.0~9.0, CAPS: pH9.0~10.0)中孵育 A13,通过 1.2.4 活性测定方法确定 pH 曲线以评估其 pH 稳定性。**热稳定性:** 将纯化后的 A13 分别在 50、60、70 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育,在不同的时间间隔,从孵育混合物中提取适当的样品,采用 1.2.4 酶活性测定方法确定残余活性。**半衰期:** 在最佳反应条件下,以未孵育处理的酶为空白对照,测定其残余活性。DAEase 的失活符合一级动力学模型^[31],所有反应均在三个独立实验中进行,其半衰期计算公式如下:

$$K_c = (2.0303/T)/\lg(E_0/E)$$

$$t_{1/2} = 0.693/K_c$$

式中: K_c 为衰减常数; E_0 为初始酶活性; E 为 T (温度)下 DAEase 的残余活性。

1.2.4 酶活性测定 反应液总体积为 1.0 mL,含有 1 $\mu\text{mol/L}$ A13、50 g/L D-果糖和 1 mmol/L CoCl_2 的 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)。将反应液在沸水中孵育

10 min 后终止反应,测定其活性。在此条件下,每分钟催化生成 1 μmol D-阿洛酮糖的酶量被定义为一个酶活性单位。利用 HPLC 法测定 A13 在反应样品中产生的 D-阿洛酮糖的量。

1.2.5 高效液相色谱(HPLC)法检测 D-阿洛酮糖 测定酶促反应中由 D-果糖转化为 D-阿洛酮糖的量以测定酶的活性。使用碳水化合物 ES 柱-w(5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm)和 1260 Infinity 蒸发光散射检测器进行分离和检测,HPLC 条件为: 75% 乙腈和 25% 去离子水作为流动相等度洗脱,进样量为 10 μL ,流速为 1.0 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,载气压力 30 psi,漂移管温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ ^[32]。测定重复三次。

1.2.6 分子动力学模拟 基于梭状芽孢杆菌(*Clostridia bacterium*) D-阿洛酮糖 3-差向异构酶(PDB ID: 7X7W)的晶体结构,使用 SWISS-MODEL 在线服务器(<https://swissmodel.expasy.org/>)建模,生成同源的 TpDAE 和 A13 的三维模型,并通过 PyMol(<http://www.pymol.org>)进行可视化分析。将预测的模型提交至 SAVES 在线服务器(<https://saves.mbi.ucla.edu/>),利用 Ramachandran 图对模型的 3D 结构参数进行评估。TpDAE 和 A13 的氨基酸交互网络分析通过 RING 服务器(<https://ring.biocomputingup.it/submit>)进行,蛋白质表面疏水性分析使用在线网站 Expasy(<https://web.expasy.org/protscale>)。

基于以上结构,开展分子动力学模拟分析,比较 TpDAE 及其祖先序列重建后 A13 的性质以阐明其热稳定性提高的分子机制。将系统的初始配置保持一致,使用 AMBER 14 软件包和 AMBER99SB 力场进行分子动力学(MD)模拟。最初的结构被放置在一个充满水分子的十二面体盒子,蛋白质分子与盒子边缘间隔为 1 nm,利用 Na^+ 或 Cl^- 中和系统的电荷。随后,为了消除潜在的不良接触,使整个系统能量最小化。在能量最小化后,整个系统在 100 ps 内从 0 逐渐加热到 343 K(70 $^{\circ}\text{C}$)。最后,在 Langevin 算法控制的温度为 343 K 和压力为 1.0 atm 条件下进行 30 ns 的分子动力学模拟,时间步长为 2 fs。

1.3 数据处理

所有实验数据均以 3 次实验结果的平均数 $\pm$ 标准误差(mean $\pm$ SE)表示。Origin 9.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 D-阿洛酮糖 3-差向异构酶的祖先序列重建

通过 FireProt^{ASR} 共检索出 110 个 DAEase 的同源序列,并在系统发育树中生成了 110 个 ASR 序列(图 1)。祖先酶通常从系统发育树的节点中预测,将根节点的祖先 DAEase 指定为 A1,一般认为 A1 是最好的祖先^[9],其可能表现出最大的进化差异,因此本研究将 A1 作为候选。事实上,通过祖先序列重建不可能确定哪个序列在进化过程中是正确的,而只能推断最可能的祖先。在重建的基础上,对重建的节

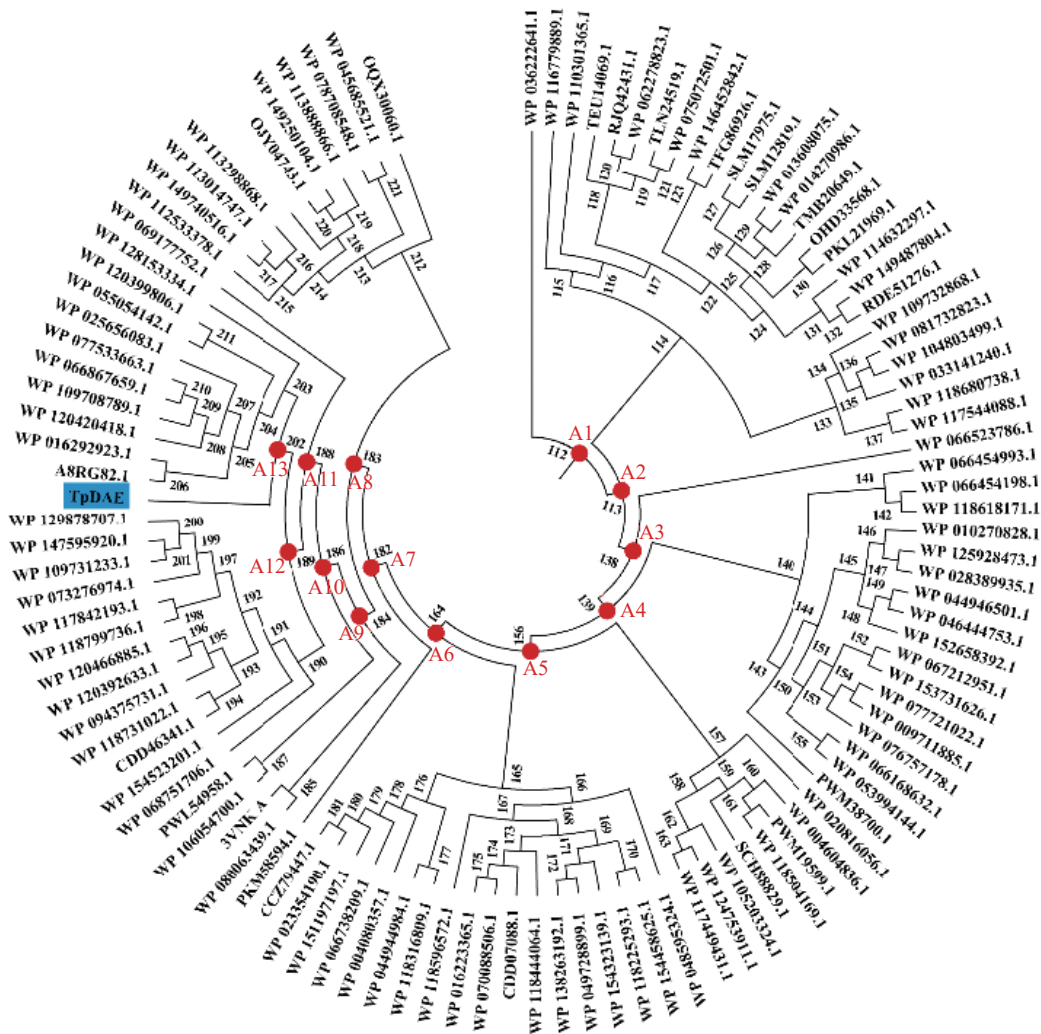


图 1 利用祖先序列重建策略复活祖先 DAEase

Fig.1 Resurrection of ancestral DAEase employing ancestral sequence reconstruction strategy

注: 红色为 ASR DAEase, 蓝色为野生型 TpDAE。

表 1 祖先酶 A13 与野生酶 TpDAE 的序列差异

Table 1 Sequence differences between A13 and TpDAE

位点	2	45	48	52	61	62	71	73	74	81	82	96	104	120	125
A13	Q	V	S	D	V	T	A	G	E	N	R	G	R	L	A
TpDAE	K	T	E	E	I	I	T	S	Q	P	A	K	K	K	E

位点	133	135	140	145	177	182	224	225	229	232	238	242	257	268	273
A13	E	I	A	R	H	V	C	I	A	H	R	T	Q	E	I
TpDAE	K	V	K	C	S	I	S	L	E	Q	N	S	S	D	A

点 ASR DAEase 进行分子对接实验, 以此作为预筛选过程后再对符合预期的 ASR DAEase 进行表征。分子对接实验中, A13 的分子对接值(-CDOCKER_ENERGY)为 8.15, 与 TpDAE 的 8.21 接近, 推测其具有与 TpDAE 相似的催化潜力, 同样作为候选进行后续表征实验, 祖先酶 A13 与野生酶 TpDAE 的序列差异共计 30 个位点, 见表 1。

2.2 ASR DAEase 的表达和纯化

本研究利用 pET22b(+) 质粒在 *E. coli* BL21 (DE3) 中成功表达了 A1 和 A13, 理论分子量均为 33.56 kDa。重组蛋白在 C 端含有额外的 His×6 标

签(HHHHHH), 采用 Ni-NTA 亲和层析法纯化从菌体裂解物中纯化目标蛋白。A1 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中虽然实现了重组表达, 但几乎没有可溶性表达, 这可能是由于重建后祖先酶具有特殊的折叠方式。A13 在 *E. coli* BL21(DE3) 中成功实现了可溶性表达, 纯化后的 A13 在 SDS-PAGE 凝胶上呈清晰的条带, 表观分子量约为 35 kDa, 但存在一些非特异性吸附杂蛋白(图 2)。以上结果表明 DAEase 是可以直接从系统进化树中成功复活并实现可溶性表达的, 因此选择具有可溶表达且具有高热稳定性潜力的 A13 进行各酶学性质的定量表征。

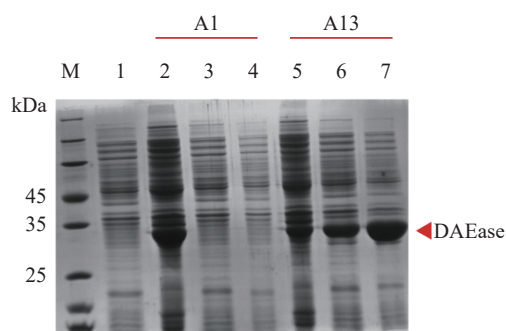


图2 在 *E. coli* BL21(DE3)中表达纯化的 A1 和 A13 的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed and purified A1 and A13 in *E. coli* BL21 (DE3)

注: M: 标准 Marker; 泳道 1: 阴性对照 (*E. coli* BL21(DE3)); 泳道 2: A1 菌体破碎悬液; 泳道 3: A1 离心后上清部分; 泳道 4: 纯化的 A1; 泳道 5: A13 菌体破碎悬液; 泳道 6: A13 离心后的上清部分; 泳道 7: 纯化的 A13。

2.3 A13 的酶学性质表征

温度是影响酶催化反应的重要因素之一。一方面高温条件可以增加底物的溶解度,加速酶促反应进程,另一方面高温条件可以提高平衡转化率并降低微生物污染。包括稀有糖在内的工业生产通常需要生物酶制剂在相对较高的温度下能够保持较高的活性。本研究在 40~80 °C 的温度范围内研究了温度对 A13 的活性影响,结果表明 A13 的最适温度为 70 °C (图 3A),比活性为 355.5 U/mg,相同条件下与 TpDAE 的最适温度和比活性基本一致^[28]。A13 在 65~75 °C 之间具有很高活性,并在该温度范围内保持其最大活性的 85% 以上,在 50~80 °C 的温度范围

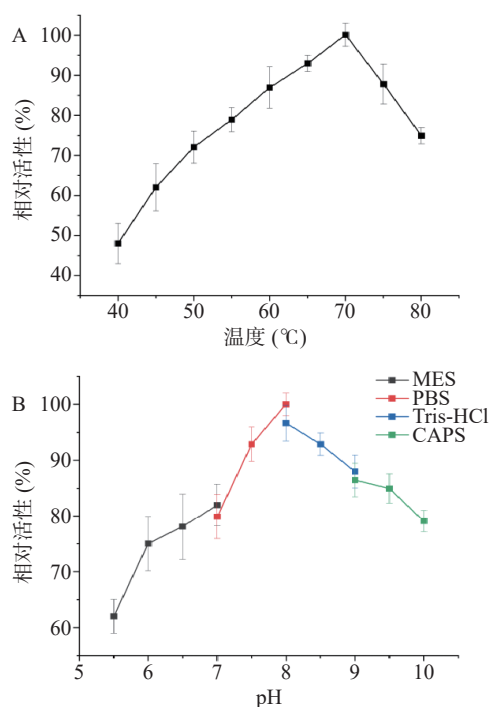


图3 温度(A)和 pH(B)对 A13 活性的影响

Fig.3 Effect of temperature and pH on the activities of A13

均显示超过 70% 相对活性,在此范围之外,相对活性急剧降低(图 3A)。这些数据表明 A13 具有成为优质生物催化剂的潜力。图 3B 显示了 pH 对 A13 活性和稳定性的影响,在 pH8.0 的 PBS 缓冲液中, A13 显示出最高活性,并在 6.0~10.0 的 pH 范围内超过 70% 相对活性。已报道的大多数 DAEase 在碱性条件下(pH7.5~9.0)表现出最佳活性,但酸性条件下碳水化合物化合物的非酶褐变会减弱,可保证产品质量的稳定。A13 在 pH6.0 时的相对活性为 75% 以上,在工业生产中具有很强的应用潜力。

2.4 A13 的热稳定性与半衰期

迄今为止报道的大多数 DAEase 的最适反应温度介于 55~70 °C 之间,但在最适温度条件下的半衰期较短,难以满足工业生产需求^[33]。如图 4 所示, A13 在 60 °C 以下是相对稳定的,在 60 °C 孵育 24 h 后,其相对活性仍可保持在 70% 以上;在最适温度 70 °C 条件下孵育 4 h,可以保持 80% 的初始活性,表现出比现有的大多数 DAEase 具有更优异的热稳定性,这与 ASR 的预期结果一致。此外,本研究通过测定 A13 的半衰期对其热稳定性进行了表征,作为蛋白质耐热性指标, A13 在其最适温度 70 °C 条件下的半衰期为 8.4 h,是 TpDAE 在相同温度下半衰期 0.28 h 的 30 倍,表明祖先序列重建后 A13 的热稳定性相较于 WT 酶显著增强。使用定向进化或蛋白质工程很难实现酶热稳定性的显著增强,但基于对酶分子非保守功能空间序列筛选重建的 ASR 在热稳定性增强方面具有广泛的应用前景^[34-36]。

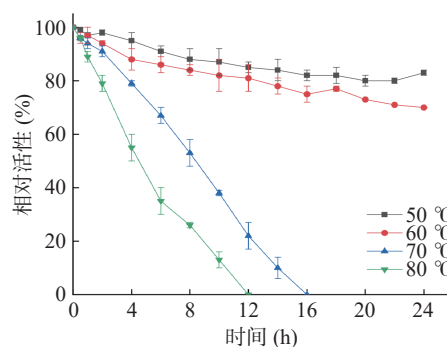


图4 A13 的热稳定性

Fig.4 Thermostability properties of A13

2.5 D-果糖向 D-阿洛酮糖的生物转化

为了评估 A13 催化 D-果糖生物转化为 D-阿洛酮糖的能力,在 500 mL 含有 1 μmol/L A13、D-果糖和 1 mmol/L CoCl₂ 的 PBS 缓冲液 (50 mmol/L, pH8.0)中进行 D-阿洛酮糖的酶促生产, D-果糖的浓度分别为 100、300 和 500 g/L。如图 5 所示,其达到平衡所需的时间分别为 60、210 和 360 min,最大转化率为 31%(155 g/L),而 TpDAE 在相同条件下达到平衡所需的时间分别为 60、180 和 360 min,最大转化率为 27.5%,表明祖先序列重建后 A13 具有良好的催化活性。

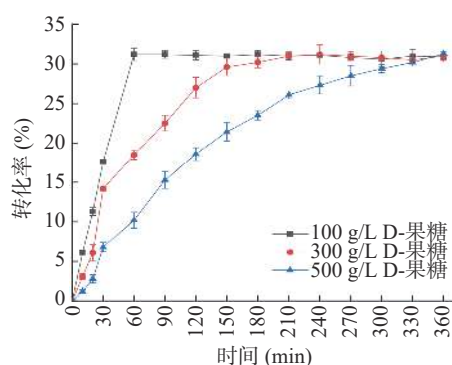


图5 纯化的 A13 催化 D-果糖生产 D-阿洛酮糖

Fig.5 Purified A13 catalyses the production of D-Allulose from D-fructose

2.6 TpDAE 和 A13 的结构分析及分子动力学模拟

TpDAE 的热稳定性较差,在 70 °C 时半衰期仅为 0.28 h^[8],而祖先序列重建后 A13 的半衰期大幅提高,本研究通过立体结构分析及分子动力学模拟实验解析了 A13 的耐热性分子机制,模型质量分析全局得分为 0.88,模型合理。基于 RING 服务器^[37] 分析的氨基酸交互网络结果显示 TpDAE 和 A13 的序列一致性为 89.5%(图 6),A13 和 TpDAE 相互作用网络中涉及的氨基酸数均为 295 个,但涉及到的氨基酸残基以及作用方式存在很大差异。A13 含有 562 个氢键和 22 个 π - π 堆叠,远超过 TpDAE 中的 359 个氢键和 15 个 π - π 堆叠,在高温下数量更多的氢键和 π - π 堆叠具有更强的分子间作用力,可以保持酶分子固有结构^[38-39],因而 A13 较 TpDAE 具有良好的热稳定性。

通过分析 TpDAE 和 A13 的结构发现,与 TpDAE 相比 A13 的 loop 结构中对热稳定性起到贡献的氨

基酸残基数量更多。在 TpDAE 的 224 位的 Ser 变为 A13 中的 Cys(图 7D),推测 Cys224 参与蛋白质内二硫键的形成,通过减小蛋白质未折叠态的熵值来维持蛋白质的稳定^[40]。在 45 号位、71 号位和 120 号位的亲水性的 Thr 和 Lys 分别变为了疏水性的 Val、Ala 和 Leu,这些疏水基团使得疏水相互作用增强,因而蛋白质抵抗热变性的能力就越强^[41](图 7A, B, C)。TpDAE 和 A13 的蛋白质表面疏水性分析结果显示 A13 在 45、71 和 120 位附近的表面疏水性同 TpDAE 相比明显增加,且整体结构的疏水性也得到了增强(图 8)。

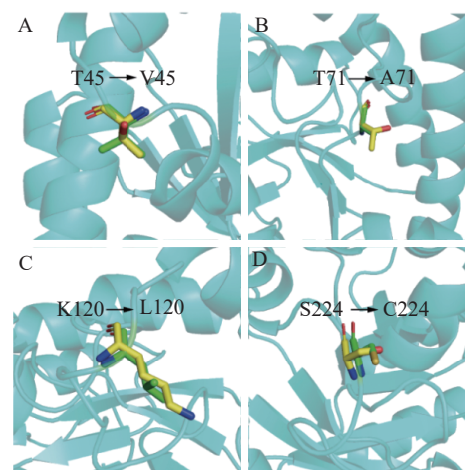


图7 A13 和 TpDAE 在 loop 位置的结构比对

Fig.7 Structure comparison of A13 and TpDAE in the loop position

注: A~D 表示不同位置 loop 的氨基酸残基比较;绿色的棒状结构表示 TpDAE,黄色的棒状结构表示 A13。

为了研究在高温催化条件下的 A13 与 TpDAE

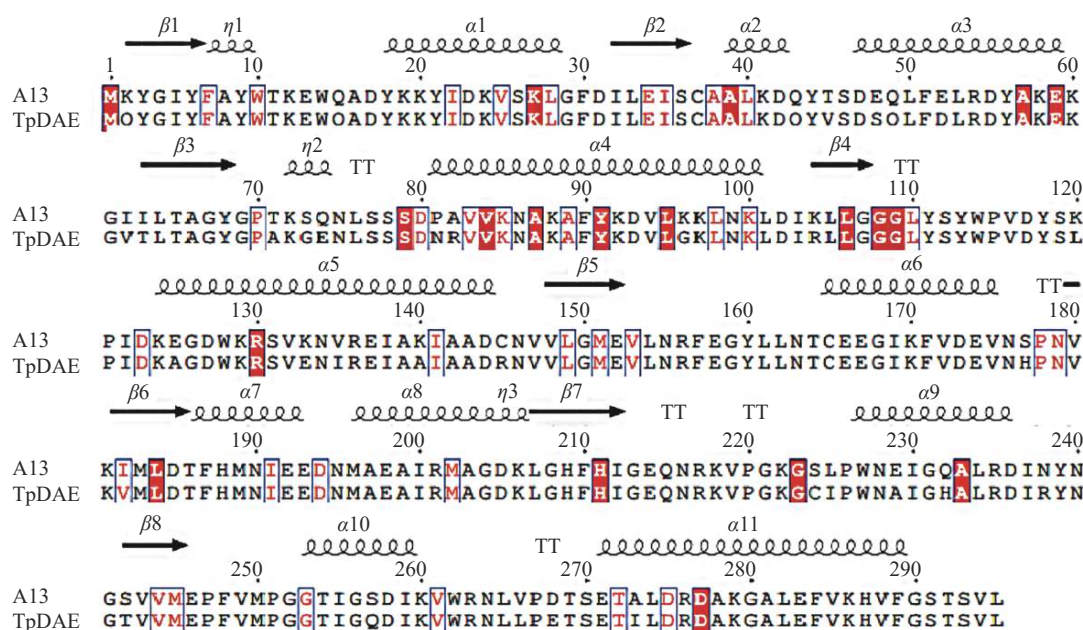


图6 A13 和 TpDAE 的序列比对结果

Fig.6 Sequence alignment results of A13 and TpDAE

注: 黑色波浪线和箭头分别代表 α -螺旋和 β -链, η_1 、 η_2 、 η_3 指无规卷曲; TT 代表 β -转角的一种形式; 在所有序列中, 相同的氨基酸残基以红色突出显示, 高度保守和相似的氨基酸残基以蓝色框出。

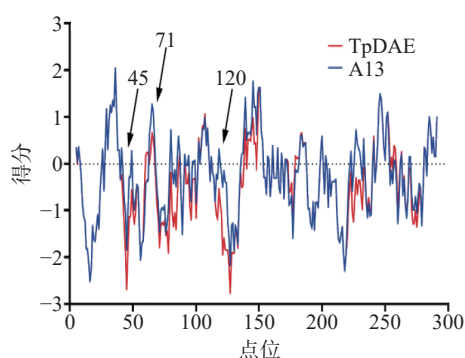


图 8 TpDAE 和 A13 的蛋白质表面疏水性

Fig.8 Protein surface hydrophobicity of TpDAE and A13

构象变化,在 70 °C 条件下对 A13 和 TpDAE 进行了 30 ns 的分子动力学模拟(图 9)。均方根偏差(RMSD)是估计蛋白质构象热波动的一个重要参数,蛋白质的热稳定性与其 RMSD 值呈负相关,而 RMSD 值与蛋白质刚性呈正相关^[42]。在前 3 ns, TpDAE 和 A13 的 RMSD 值迅速增加至 1.8 Å 和 1.3 Å,此后 A13 的 RMSD 值稳定在 1.2~1.6 Å 的范围内直至模拟结束(t=30 ns)。在 20 ns 时, TpDAE 的 RMSD 值达到了最高值 2.1 Å,而在相同条件下, A13 的 RMSD 值仍稳定在 1.3 Å。分子模拟轨迹显示,在 70 °C 条件下 A13 的平均 RMSD 值变化约为 0.5 Å,变化平缓,表明其整体构象稳定,活性位点结构紧凑,热稳定性较好;TpDAE 的平均 RMSD 值变化约为 0.9 Å,变化幅度较大,表明其结构更为疏松,推测高温可能会导致其活性位点形变,使其酶活性降低甚至丧失。Wei 等^[43]通过综合计算辅助重新设计来提高用于 D-阿洛糖合成的 L-鼠李糖异构酶的热稳定性,所得组合突变体 M2-4 在 75 °C 下的半衰期延长了 5.7 倍,分子动力学模拟研究表明在 348 K 时, M2-4 的 RMSD 值变化较小,超过 100 ns 时的平均 RMSD 为 0.17 Å,整体构象稳定,相比之下, WT 的 RMSD 曲线在开始时急剧增加,60 ns 后波动稳定,总体构象波动较大,平均 RMSD 为 0.23 Å,引入 M2-4 的变异使柔性区域硬化,导致在高温下稳定折叠。本文分子动力学模拟结果解释了 A13 在高温下能表现出更强的稳定性催化性能分子机制,证明了祖先序列重建策略的可靠性。

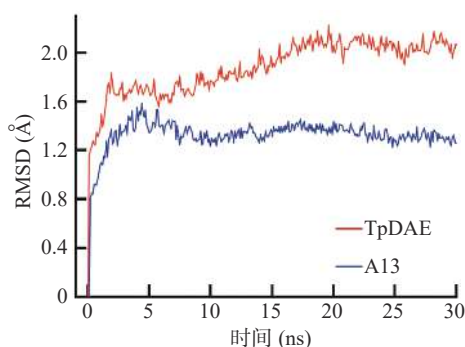


图 9 A13 和 TpDAE 在 70 °C 下的均方根偏差(RMSD)曲线

Fig.9 Root mean square deviation (RMSD) profile for A13 and TpDAE as per time at 70 °C

3 结论

传统高性能的酶基因的挖掘受到筛选方式和样品发掘等因素的限制。ASR 与其他工程方法不同,它基于对非保守功能空间的筛选来生成新序列,在给定准确的序列比对的前提下,许多输出都具有很高的功能性。本研究通过祖先序列重建获取的 DAEase A13 是一种很有前途的工业生物催化剂,其表现出与 TpDAE 相似的表达水平和催化活性,但热稳定性显著提高,证明了 ASR 策略的有效性与可行性,它可以改造出具有良好生物催化性能的酶分子。此外,祖先序列重建可能有助于识别调节酶活性的关键位点以避免改造的盲目性和实验工作量。本研究利用 ASR 充实了对新型 DAEase 生物催化剂的挖掘工作,实现了在 DAEase 新型酶基因挖掘技术上的探索。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] GUMULYA Y, GILLAM E M. Exploring the past and the future of protein evolution with ancestral sequence reconstruction: The 'retro' approach to protein engineering[J]. *Biochemical Journal*, 2017, 474(1): 1-19.
- [2] MERKL R, STERNER R. Ancestral protein reconstruction: techniques and applications[J]. *Biological Chemistry*, 2016, 397(1): 1-21.
- [3] SELBERG A G A, GAUCHER E A, LIBERLES D A. Ancestral sequence reconstruction: From chemical paleogenetics to maximum likelihood algorithms and beyond[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2021, 89(3): 157-164.
- [4] RISSO V A, SANCHEZ-RUIZ J M, OZKAN S B. Biotechnological and protein-engineering implications of ancestral protein resurrection[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 51: 106-115.
- [5] WHITFIELD J H, ZHANG W H, HERDE M K, et al. Construction of a robust and sensitive arginine biosensor through ancestral protein reconstruction[J]. *Protein Science*, 2015, 24(9): 1412-1422.
- [6] WILDING M, PEAT T S, KALYAANAMOORTHY S, et al. Reverse engineering: Transaminase biocatalyst development using ancestral sequence reconstruction[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19: 5375-5380.
- [7] BABKOVA P, SEBESTOVA E, BREZOVSKY J, et al. Ancestral haloalkane dehalogenases show robustness and unique substrate specificity[J]. *Chembiochemistry*, 2017, 18(14): 1448-1456.
- [8] JOHO Y, VONGSOUTH V, SPENCE M A, et al. Ancestral sequence reconstruction identifies structural changes underlying the evolution of *Ideonella sakaiensis* petase and variants with improved stability and activity[J]. *Biochemistry*, 2023, 62(2): 437-450.
- [9] GUMULYA Y, BAEK J M, WUN S J, et al. Engineering highly functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction[J]. *Nature Catalysis*, 2018, 1: 878-888.
- [10] SPENCE M A, KACZMARSKI J A, SAUNDERS J W, et al. Ancestral sequence reconstruction for protein engineers[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2021, 69: 131-141.
- [11] FOLEY G, MORA A, ROSS C M, et al. Engineering indel

- and substitution variants of diverse and ancient enzymes using graphical representation of ancestral sequence predictions (GRASP)[J]. *PLoS Computational Biology*, 2022, 18(10): e1010633.
- [12] GOLDENZWEIG A, GOLDSMITH M, HILL S E, et al. Automated structure and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(2): 337–346.
- [13] YANG Z. PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586–1591.
- [14] CHEN X, DOU Z, LUO T, et al. Directed reconstruction of a novel ancestral alcohol dehydrogenase featuring shifted pH-profile, enhanced thermostability and expanded substrate spectrum[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127886.
- [15] PRAMANIK S, CONTRERAS F, DAVARI M D, et al. Protein engineering by efficient sequence space exploration through combination of directed evolution and computational design methodologies[J]. *Protein Engineering*, 2021: 153–176.
- [16] YU H, DALBY P A. Coupled molecular dynamics mediate long- and short-range epistasis between mutations that affect stability and aggregation kinetics[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(47): e11043–e11052.
- [17] FUKADA K, ISHII T, TANAKA K, et al. Crystal structure, solubility, and mutarotation of the rare monosaccharide D-psicose[J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2010, 83: 1193–1197.
- [18] MU W, ZHANG W, FENG Y, et al. Recent advances on applications and biotechnological production of D-psicose[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1461–1467.
- [19] SHINTANI T, YAMADA T, HAYASHI N, et al. Rare sugar syrup containing D-allulose but not high-fructose corn syrup maintains glucose tolerance and insulin sensitivity partly via hepatic glucokinase translocation in wistar rats[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(13): 2888–2894.
- [20] ZHANG W, FANG D, XING Q, et al. Characterization of a novel metal-dependent D-psicose 3-epimerase from *Clostridium scindens* 35704[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62987.
- [21] ZHANG W, YU S, ZHANG T, et al. Recent advances in D-allulose: Physiological functionalities, applications, and biological production[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2016, 54: 127–137.
- [22] KIM S E, KIM S J, KIM H J, et al. D-Psicose, a sugar substitute, suppresses body fat deposition by altering networks of inflammatory response and lipid metabolism in C57BL/6J-ob/ob mice[J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 28: 265–274.
- [23] SUNA S, YAMAGUCHI F, KIMURA S, et al. Preventive effect of D-psicose, one of rare ketohexoses, on di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced testicular injury in rat[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 173(2): 107–117.
- [24] IZUMORI K. Bioproduction strategies for rare hexose sugars[J]. *Naturwissenschaften*, 2002, 89(3): 120–124.
- [25] KIM H J, HYUN E K, KIM Y S, et al. Characterization of an agrobacterium tumefaciens D-psicose 3-epimerase that converts D-fructose to D-psicose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 981–985.
- [26] CHEN Z, GAO X D, LI Z. Recent advances regarding the physiological functions and biosynthesis of D-allulose[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 881037.
- [27] ZHANG W, WEI M, SUN X, et al. Fine-tuning of carbon flux and artificial promoters in *Bacillus subtilis* enables high-level biosynthesis of D-allulose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(43): 13935–13944.
- [28] ZHANG W, ZHANG T, JIANG B, et al. Biochemical characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Treponema primitia* ZAS-1 and its application on enzymatic production of D-psicose[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(1): 49–56.
- [29] MU W, CHU F, XING Q, et al. Cloning, expression, and characterization of a D-psicose 3-epimerase from *Clostridium cellulosyticum* H10[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 7785–7792.
- [30] WANG Y, RAVIKUMAR Y, ZHANG G, et al. Biocatalytic synthesis of D-allulose using novel D-tagatose 3-epimerase from *Christensenella minuta*[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 622325.
- [31] SAKODA M, HIROMI K. Determination of the best-fit values of kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation by the method of least squares with the Taylor expansion[J]. *The Journal of Biochemistry*, 1976, 80(3): 547–555.
- [32] QI H, WANG T, LI H, et al. Sequence- and structure-based mining of thermostable D-allulose 3-epimerase and computer-guided protein engineering to improve enzyme activity[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(47): 18431–18442.
- [33] PATEL S N, KAUSHAL G, SINGH S P. A novel D-allulose 3-epimerase gene from the metagenome of a thermal aquatic habitat and D-allulose production by *Bacillus subtilis* whole-cell catalysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(5): e02605–19.
- [34] CHEN S, XU Z, DING B, et al. Big data mining, rational modification, and ancestral sequence reconstruction inferred multiple xylose isomerases for biorefinery[J]. *Science Advances*, 2023, 9(5): 1–16.
- [35] THOMSON R E S, CARRERA-PACHECO S E, GILLAM E M J. Engineering functional thermostable proteins using ancestral sequence reconstruction[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022: 102435.
- [36] LIVADA J, VARGAS A M, MARTINEZ C A, et al. Ancestral sequence reconstruction enhances gene mining efforts for industrial ene reductases by expanding enzyme panels with thermostable catalysts[J]. *ACS Catalysis*, 2023, 13(4): 2576–2585.
- [37] PIOVESAN D, MINERVINI G, TOSATTO S C. The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W367–374.
- [38] TOMPA D R, GROMIHA M M, SARABOJI K. Contribution of main chain and side chain atoms and their locations to the stability of thermophilic proteins[J]. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 2016, 64: 85–93.
- [39] WANG Q, CEN Z, ZHAO J. The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: An angle of omics[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2015, 30(2): 97–106.
- [40] HARADA T, KURIMOTO E, TOKUHIRO K, et al. Disulfide bond formation in refolding of thermophilic fungal protein disulfide isomerase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, 91(6): 596–598.
- [41] DIAS C L, ALA-NISSILA T, WONG-EKKABUT J, et al. The hydrophobic effect and its role in cold denaturation[J]. *Cryobiology*, 2010, 60(1): 91–99.
- [42] BADIEYAN S, BEVAN D R, ZHANG C. Study and design of stability in GH5 cellulases[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(1): 31–44.
- [43] WEI M, GAO X, ZHANG W, et al. Enhanced thermostability of an L-rhamnose isomerase for D-allose synthesis by computation-based rational redesign of flexible regions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(42): 15713–15722.