DOI:10.12441/spyswjs.20231215001 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0023-10

联合突变对 α-*L*-鼠李糖苷酶性质的影响

唐艺玲[1] 刘小琴[1] 李 乐[1] 李利君[1,2,3*] 倪 辉[1,2,3,4]

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院,福建 厦门 361021; 2. 集美大学福建省食品微生物与酶工程重点实验室,福建 厦门 361021; 3. 集美大学厦门市食品生物工程技术研究中心,福建 厦门 361021; 4. 厦门海洋职业技术学院海洋生物学院,福建 厦门 361100)

摘要:【目的】提升 α-*L*-鼠李糖苷酶(EC 3.2.1.40)的催化活性、热稳定性和 pH 稳定性。**【方法】**基于已改良的单点突变体,构建了 3 个联合突变体:K423R-R307Y-D508N、K423R-R307Y-N561D 和 K389R-R307Y-N561D。**【结果】**相比于原始酶(wild type,WT),K423R-R307Y-D508N 在温度为 65、70 ℃时的半衰期均提高了 0.24 min,在 pH 为 7.0、8.0 时的半衰期分别提高了 145.64、4.91 min,但其相对酶活力仅为 WT 的 41.01%;K423R-R307Y-N561D 在 pH 为 7.0、8.0 时的半衰期分别提高了 51.42、20.65 min,相对酶活力为 WT 的 63.26%;K389R-R307Y-N561D 的相对酶活力是 WT 的 167.20%,在温度为 65、70 ℃时的半衰期分别提高了 1.60、1.34 min,但在碱性环境下的 pH 稳定性未发生明显变化。通过分子对接、分子动力学模拟和 MM-PBSA 分析发现,K389R-R307Y-N561D 的催化结构域 Loop 区和底部部分 α 螺旋结构的柔性增大,使酶与底物结合更充分,提升了亲和性;但 R307 突变引发局部扰动,破坏氢键网络及 π-π 疏水相互作用,导致结构稳定性下降。**【结论】**联合突变触发位点补偿机制是 α-*L*-鼠李糖苷酶催化活性与结构稳定性难以协同提升的主要原因。

关键词:α-*L*-鼠李糖苷酶;联合突变;位点组合效应;分子动力学模拟

Effects of Combined Mutations on the Properties of α-*L*-Rhamnosidase

TANG Yiling[1] *LIU Xiaoqin*[1] *LI Le*[1] *LI Lijun*[1,2,3*] *NI Hui*[1,2,3,4]

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 3. Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Jimei University, Xiamen 361021, China; 4. Faculty of Marine Biology, Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to enhance the catalytic activity, thermal stability, and pH stability of α-*L*-rhamnosidase (EC 3.2.1.40). [**Method**] Three combined mutants (K423R-R307Y-D508N, K423R-R307Y-N561D, and K389R-R307Y-N561D) were constructed based on improved single-point mutants. [**Result**] Compared with the wild type (WT), the combined mutants K423R-R307Y-D508N exhibited an increased half-life of 0.24 min at both 65 ℃ and 70 ℃. Additionally, its half-life improved by 145.64 min and 4.91 min at pH 7.0 and pH 8.0, respectively. However, its relative enzyme activity was only 41.01% of that of the WT. The combined mutant K423R-R307Y-N561D exhibited an increased half-life of 51.42 min and 20.65 min at pH 7.0 and pH 8.0, respectively, and its relative enzyme activity were 63.26% of that of the WT. The combined mutant K389R-R307Y-N561D achieved an relative enzyme activity 167.20% of that of the WT, with an increased half-life of 1.60 min and 1.34 min at 65 ℃ and 70 ℃, respectively. However, its stability in alkaline environments did not show significant improvement. Molecular docking, molecular dynamics simulations, and MM-PBSA analyses

基金项目:国家自然科学基金面上项目(32170056)。

通信作者:李利君(1973—),女,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品化学与食品生物技术研究。E-mail: ljli@jmu.edu.cn

收稿日期:2023-12-15 **修回日期:**2024-03-04

revealed that the increased flexibility of the catalytic domain Loop region and partial α helix structure at the bottom of K389R-R307Y-N561D enhanced substrate binding and affinity. However, the R307 mutation induced local perturbations, disrupting the hydrogen bond network and π-π hydrophobic interactions, leading to decreased structural stability. [**Conclusion**] The site compensation mechanism triggered by combined mutations is the primary reason for the difficulty in simultaneously enhancing the catalytic activity and structural stability of *α-L*-rhamnosidase.

Keywords: *α-L*-rhamnosidase; combined mutations; site combination effect; molecular dynamics simulation

α-L-鼠李糖苷酶是一种水解天然类黄酮和萜烯基糖苷末端*L*-鼠李糖基的糖苷酶[1]。*α-L*-鼠李糖苷酶主要应用于食品、医药等领域，例如*α-L*-鼠李糖苷酶可通过水解柑橘类果汁中引起苦味的物质——柚皮苷，使得果汁苦味减少[2]；*α-L*-鼠李糖苷酶可通过作用于萜烯基糖苷释放游离单萜等方法来改善葡萄酒和饮料的香气成分[3]；将柚皮苷氢化成柚皮苷二氢查尔酮后，使用固定化*α-L*-鼠李糖苷酶进行酶促水解，可除去柚皮苷二氢查尔酮的鼠李糖基，以此来制备天然甜味剂[4]、普鲁宁等活性物质[5]。

在实际应用中，对*α-L*-鼠李糖苷酶的催化活性、温度和pH稳定性等有较高要求，已有研究采用定向进化、结构改造等方法，提升了天然酶的稳定性和催化活性[6-9]。根据*α-L*-鼠李糖苷酶“活性口袋”内径大小、关键氨基酸等因素进行理性设计，得到的单点突变体改善了酶的催化活性，提高了水解底物的效率[10-13]。基于柔性区域、氨基酸置换、PoPMuSiC预测等方法设计的单点突变体，使*α-L*-鼠李糖苷酶的pH稳定性、热稳定性得到了明显提高[14-15]。这些单点突变的运用在一定程度上改善了酶的特性，但将所得单点突变进行联合突变是否能更好地提高*α-L*-鼠李糖苷酶的性质还有待研究。

目前基于联合突变改善*α-L*-鼠李糖苷酶的研究较少，Lu等[16]和Ge等[17]利用B-factor、引入二硫键等方法设计出的双点突变体，其热稳定性显著提高。作者所在课题组前期通过对不同来源的*α-L*-鼠李糖苷酶进行序列比对和动力学模拟分析，筛选出了分别在热稳定性[18]和催化活性[19]有较大提升的双点突变体。这些双点突变体的设计均是在单一性质（如热稳定性）改善的单点突变基础上进行组合突变，通过探讨不同突变点间的协同关系，发现目前尚缺乏基于不同性质改良（如酶的活性、热稳定性）的组合突变研究。

为研究针对不同性质设计的*α-L*-鼠李糖苷酶单点突变位点间的组合效应，作者在前期研究得到的催化活性（D508N、N561D）[12]、热稳定性（K389R、K423R）[14]、pH稳定性（R307Y）[15]提高的单点突变基础上（见表1），构建了3个三点联合突变体K423R-R307Y-D508N、K423R-R307Y-N561D、K389R-R307Y-N561D，研究了突变体性质的变化，并采用分子对接、分子动力学模拟分析了联合突变体与WT的结构差异，探究位点间的微扰对该酶催化活性和结构稳定性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌（*E. coli*）DH5α和毕赤酵母SMD1168菌株由作者所在实验室保藏；黑曲霉来源*α-L*-鼠李糖苷酶基因的质粒载体pPIC9K-rha以及其单点突变体R307Y、K389R、K423R、D508N

表1 单点突变体的酶学性质变化

Table 1 Changes in enzymatic properties of single-point mutants

单点突变体	突变后酶学性质变化
R307Y	pH为8.0~12.0时，稳定性均有不同程度提升
K389R	与WT相比，在60、65、70 ℃时的半衰期分别提高了2.0 h、11.0 min和0.6 min
K423R	与WT相比，在60、65、70 ℃时的半衰期分别提高了0.5 h、11.0 min和1.8 min
D508N	相比于WT，酶活性提高了185%，K_m值降低了7.87 mmol/L，催化速率（k_{cat}/K_m）提高了1.54倍
N561D	相比于WT，酶活性提高了130%，K_m值降低了5.20 mmol/L，催化速率（k_{cat}/K_m）提高了1.05倍

和N561D是作者所在实验室前期构建的。

DNA Marker、限制性内切酶*Sal* I：宝生物工程（大连）有限公司；质粒小提试剂盒（离心柱型）、DNA纯化回收试剂盒（离心柱型）：天根生化科技（北京）有限公司；位点特异性突变导入试剂盒：东洋纺（上海）生物科技有限公司；SDS-PAGE凝胶快速配制试剂盒：上海碧云天生物技术有限公司；对硝基苯基-α-*L*-吡喃鼠李糖苷（*p*NPR）：美国Sigma公司；其余化学试剂（分析纯）：国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

PCR仪：TC-96/G/H（b）C型，杭州博日科技股份有限公司；恒压恒流电泳仪：Mini-PROTEAN Tetra电泳槽型，美国Bio-Rad公司；酶标仪：Epoch 2T型，美国BioTek公司；基因导入仪：GP-3000型，宁波新芝生物科技股份有限公司；高效液相色谱仪：1260 Infinity III型，美国Agilent Technologies公司；高速冷冻离心机：Avanti J-26S XP型，美国Beckman Coulter公司；凝胶成像仪：GEAI600型，美国General Electric公司；蛋白质纯化仪：AKTA PURE 150L型，美国General Electric公司。

1.3 方法

1.3.1 联合突变体质粒的构建和转化

对作者所在课题组前期构建的单点突变体提取质粒，进行点突变，构建三点联合突变质粒并转化至*E.coli* DH5α感受态细胞，进行Amp抗性筛选、菌液PCR、琼脂糖凝胶电泳验证并测序。将测序成功的联合突变体质粒线性化，转化至毕赤酵母感受态细胞，进行G418抗性筛选，单菌落扩大培养，保存菌种并鉴定。

1.3.2 联合突变体的表达和纯化

将体积分数1%的菌株接种至BMGY培养基中，当OD_{600}值达到3.0时，收集菌体并重悬于BMMY培养基中，每隔24 h添加500 μL甲醇溶液诱导表达。诱导表达7 d后，于8 000 r/min、4 ℃离心15 min，收集上清液备用。通过疏水柱对上清液中目的蛋白质进行富集，用强阴离子柱和Superdex 200 10/300 GL分子筛对目的蛋白质进行分离纯化，收集出峰样品进行SDS-PAGE分析、相对酶活力检测和蛋白质质量浓度测定。

1.3.3 联合突变体酶学性质的测定

1）相对酶活力的测定：将WT与突变体的蛋白质质量浓度设为一致，以灭活酶作为对照组，反应体系为：120 μL酶反应缓冲液（pH 4.0）、60 μL底物（*p*NPR溶液）和20 μL酶液。于60 ℃下反应10 min，迅速加入200 μL碳酸钠溶液终止反应，取200 μL反应液测定其在410 nm下的吸光度。

2）最适温度的测定：参照相对酶活力的测定方法，分别在30、40、50、60、70、80 ℃进行反应，其他反应条件不变，测定反应液的吸光度。

3）温度稳定性的测定：参照相对酶活力的测定方法，将酶液分别置于65、70 ℃恒温水浴锅中处理一定时间，其他反应条件不变，测定反应液的吸光度。

4）最适pH的测定：参照相对酶活力的测定方法，在pH为3.0~8.0的条件下分别进行反应，其他反应条件不变，测定反应液的吸光度。

5）pH稳定性的测定：参照相对酶活力的测定方法，分别在pH为7.0、8.0的条件下，于37 ℃处理一定时间，其他反应条件不变，测定反应液的吸光度。

1.3.4 分子对接

基于作者所在课题组解析的黑曲霉α-*L*-鼠李糖苷酶（NCBI：AGN92963.1）的晶体结构，底物*p*NPR的三维结构由Chembio Office 2016构建并进行能量最小化。使用Autodock Tools对蛋白质、底物结构文件进行前处理；采用Autodock Vina进行分子对接，对接盒子大小为2.0 nm×3.0 nm×2.2 nm，对接中心为（−9.615，−21.39，17.235）。使用Discovery Studio、PyMOL分析酶−底物相互作用力并进行可视化作图。

1.3.5 分子动力学模拟

使用ATB网站生成底物分子的拓扑文件，用Gromacs 5.14并选择GROMOS96 54a7力场计算原子参数进行纯蛋白质、酶−底物复合物体系的30 ns模拟，每个体系进行3次平行模拟，筛选相对平稳的模拟轨迹进行后续分析。通过MM-PBSA方法，分析酶与底物结合时各个氨基酸相互作用的能量变化。

1.3.6 数据处理

每组试验设置3个平行，取平均值，采用Excel 2019和Origin 2023软件进行数据处理及相关图表的绘制。

2 结果与讨论

2.1 联合突变体的构建及酶学性质分析

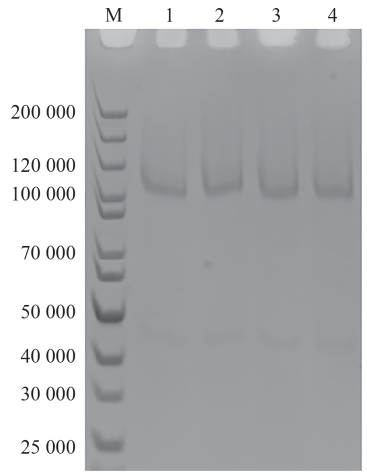
2.1.1 联合突变体的构建

如图1所示，将WT以及3个联合突变体进行发酵并诱导表达，将获得的酶液进行SDS-PAGE检测，目的条带的相对分子质量均在100 000左右，分离纯化后测定其酶学性质。

2.1.2 联合突变体的酶学性质

将WT、联合突变体的蛋白质质量浓度设为一致，于相同条件下测定相对酶活力。如图2所示，K389R-R307Y-N561D相对酶活力提高幅度较大，为WT相对酶活力的167.20%；K423R-R307Y-D508N和K423R-R307Y-N561D的相对酶活力降低幅度较大，可能影响其酶学性质的测定。

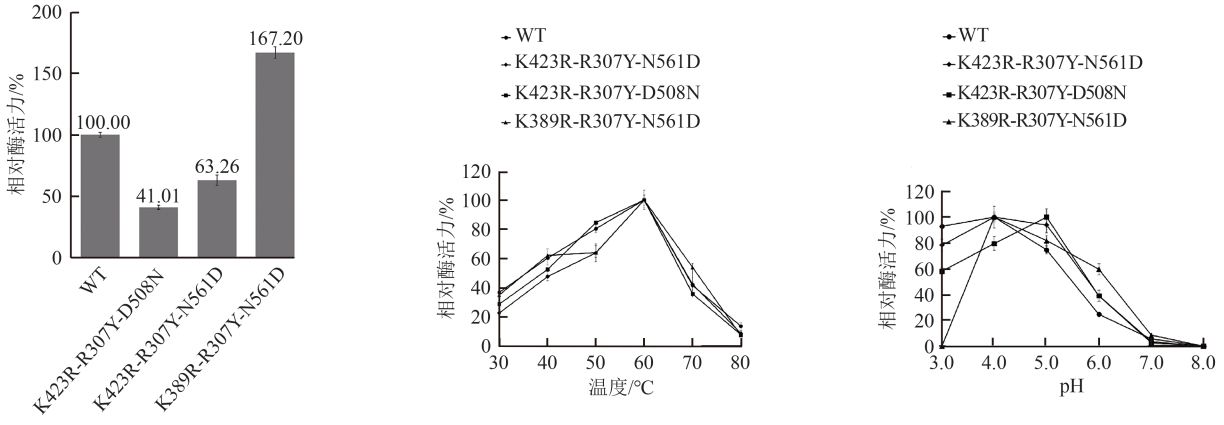
WT、联合突变体的最适温度、pH测定结果见图2，联合突变体中仅K423R-R307Y-D508N的最适pH为5.0，其最适pH发生了偏移，pH变化对K389R-R307Y-N561D的相对酶活力影响较大，其他联合突变体的最适温度（60 ℃）、pH（4.0）均未发生较大偏移。测定不同条件下酶的热稳定性、pH稳定性并分别计算半衰期，见表2。在pH为7.0时，K423R-R307Y-D508N、K423R-R307Y-N561D、K389R-R307Y-N561D的半衰期分别比WT提高了145.64、51.42、15.39 min；在pH为8.0时，K423R-R307Y-D508N、K423R-R307Y-N561D的半衰期分别比WT提高了4.91、20.65 min，K389R-R307Y-N561D的半衰期与WT相比差别较小。结果表明，联合突变体在pH 7.0~8.0下的稳定性有不同程度提升，但热稳定性与WT相比没有明显差异。



M—Marker；1—WT；
2—K423R-R307Y-D508N；
3—K423R-R307Y-N561D；
4—K389R-R307Y-N561D。

图1 WT和各联合突变体的SDS-PAGE分析

Fig. 1 SDS-PAGE of WT and combined mutants



(a) 相对酶活力 (b) 温度 (c) pH

图2 WT和各联合突变体的相对酶活力、温度和pH

Fig. 2 Relative enzymatic activities, temperatures, and pH of WT and combined mutants

综上所述，相较于WT，K423R-R307Y-D508N、K423R-R307Y-N561D的相对酶活力降低幅度较大，K389R-R307Y-N561D相对酶活力提高幅度较大；联合突变体的热稳定性提升幅度较小，碱性条件下的pH稳定性有不同程度提升，推测联合突变对酶的结构稳定性影响不明显。

表2　WT及各联合突变体在65、70 ℃和pH 7.0、8.0时的半衰期

Table 2　Half-lives of WT and combined mutants at 65 ℃ and 70 ℃, pH 7.0 and pH 8.0

单位：min

条件	WT 半衰期	K423R-R307Y-D508N 半衰期	K423R-R307Y-N561D 半衰期	K389R-R307Y-N561D 半衰期
65 ℃	14.23	14.47	13.70	15.83
70 ℃	1.07	1.31	1.45	2.41
pH 7.0	32.09	177.73	83.51	47.48
pH 8.0	16.62	21.53	37.27	16.33

2.2　*α-L*-鼠李糖苷酶和联合突变体与*p*NPR的分子对接

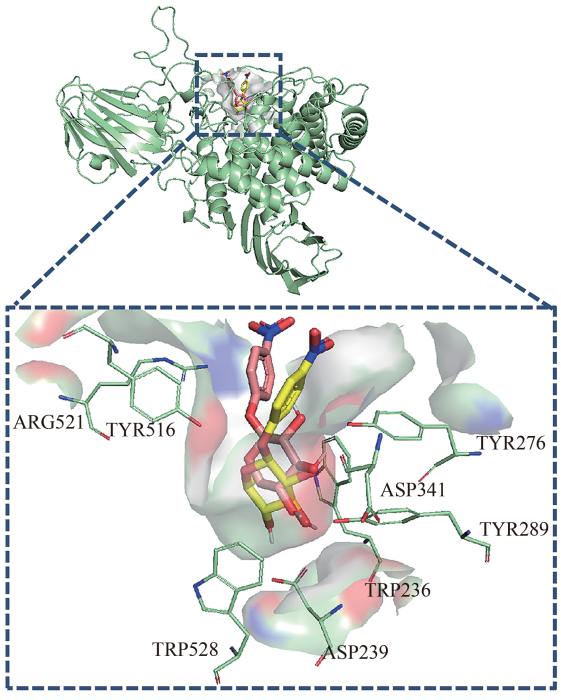
相较于其余2个联合突变体，K389R-R307Y-N561D的综合性质改良较好，因此将K389R-R307Y-N561D与*p*NPR进行分子对接，探究联合突变对底物结合的影响。如图3所示，WT-*p*NPR的对接自由能为−28.45 kJ/mol，K389R-R307Y-N561D-*p*NPR的对接自由能为−31.38 kJ/mol，*p*NPR末端鼠李糖在K389R-R307Y-N561D结合区域的位置更深，底物的硝基苯与Y276形成π-π堆叠、氢键作用，*p*NPR以糖苷键为轴，结构小幅度折叠，更充分地暴露糖苷键，推测K389R-R307Y-N561D能提高酶水解*p*NPR的相对酶活力的原因是其对底物的亲和力高于WT。

综上所述，联合突变可影响底物结合在活性区域的深浅程度，进而影响氨基酸作用底物的位置、作用效果及构象稳定性，最终表现为WT、联合突变体与*p*NPR亲和力的差异。

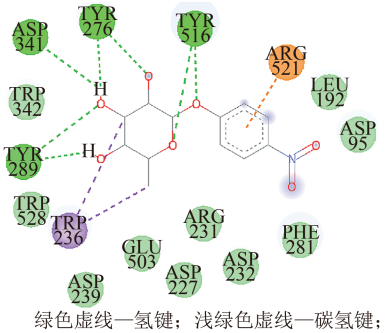
2.3　*α-L*-鼠李糖苷酶和联合突变体的分子动力学模拟

2.3.1　纯蛋白质体系的结构差异性、刚柔性分析

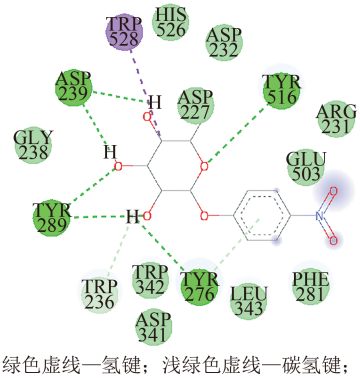
纯蛋白质体系中蛋白质结构的均方根偏差（root mean square deviation，RMSD）和回旋半径（R_g）见图4，2个体系的RMSD最终平衡在0.4 nm左右，截取轨迹进行蛋白质结构域叠合比对（见表3），相比β折叠结构域，$(α/α)_6$桶状催化结构域的结构在联合突变时有了一定偏差。WT体系R_g波动范围小于K389R-R307Y-N561D体系，进一步说明联合突变对酶的结构稳定性无明显影响。



(a) WT-*p*NPR（粉色）、K389R-R307Y-N561D-*p*NPR（黄色）对接最佳构象



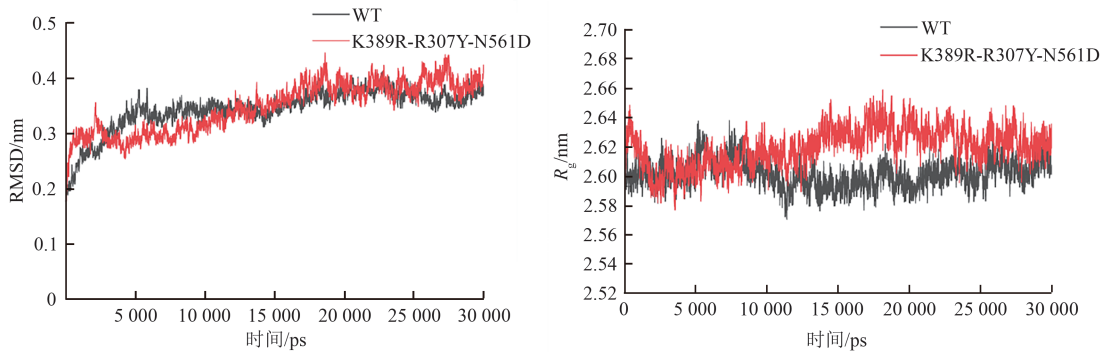
绿色虚线—氢键；浅绿色虚线—碳氢键；
橙色虚线—π-阳离子相互作用；
紫色虚线—π-σ相互作用。
(b) WT-*p*NPR最佳构象的相互作用力



绿色虚线—氢键；浅绿色虚线—碳氢键；
紫色虚线—π-σ相互作用。
(c) K389R-R307Y-N561D-*p*NPR最佳构象的相互作用力

图3　WT、K389R-R307Y-N561D对接*p*NPR的最佳构象及其相互作用力

Fig. 3　Optimal conformations of WT and K389R-R307Y-N561D docking *p*NPR and its interaction force



(a) WT与K389R-R307Y-N561D的RMSD　　(b) WT与K389R-R307Y-N561D的R_g

图 4　WT 与 K389R-R307Y-N561D 的 RMSD 和 R_g

Fig. 4　RMSD and R_g of WT and K389R-R307Y-N561D

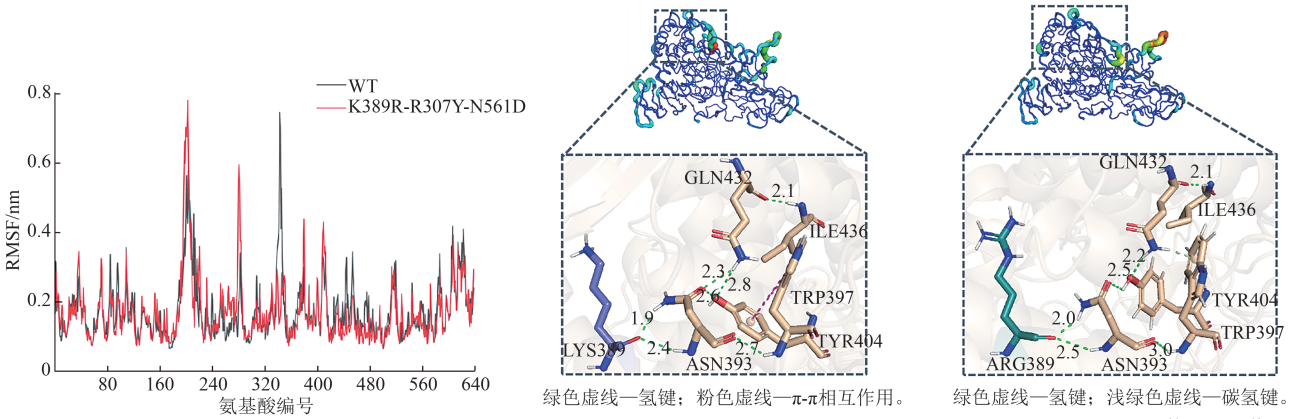
表 3　WT 与 K389R-R307Y-N561D 结构比对

Table 3　Comparison of structures between WT and K389R-R307Y-N561D

蛋白质结构比对	RMSD/nm
整体蛋白质结构	0.246 4
$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域	0.209 5
N 端 β 折叠结构域	0.156 4
C 端 β 折叠结构域	0.143 0

如图 5 所示，结合纯蛋白质体系中的氨基酸均方根波动（root mean square fluctuation，RMSF）、显著变化区域及蛋白质结构 B-factor 值（颜色由深蓝色到红色表示由刚性到柔性）发现，$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域上方 Loop 区和底部的柔性变化明显，主要原因是 N561D 突变引起$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域上方 Loop 区灵活度增强，可促进底物更好地进入结合区域，但由于结构间的构象调整，$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域上方柔性增强，联动底部柔性同时增大，LYS389 突变为 ARG 后更易质子化，ARG 的羧基对 ASN393 的氨基极化影响程度高，ASN393 更靠近 ARG，导致其远离 GLN432，不足以形成氢键，进而直接影响作用距离 1.0 nm 内的 ASN393、TYR404、GLN432 构成的稳定“三角形”氢键网络被破坏，且 TYR404 与 TRP397 的 π-π 堆叠的疏水相互作用也被破坏。蛋白质结构的稳定性与氢键数量存在相关性，构成氢键网络的残基突变可能会影响酶的稳定性，氢键数量减少也表明稳定性可能随之降低[20-21]。

综上，联合突变提高酶对 *p*NPR 亲和力的原因是$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域 Loop 间协调运动增强，可与底物更好接触并促进其运动至结合区，但同时桶状结构底部的稳定性也受影响，氨基酸局部扰动使得氢键网络被破坏，联动催化结构域底部柔性增大，使结构稳定性下降。



(a) WT与K389R-R307Y-N561D的RMSF

(b) WT的B-factor值及细节差异图

绿色虚线—氢键；粉色虚线—π-π相互作用。

(c) K389R-R307Y-N561D的B-factor值及细节差异图

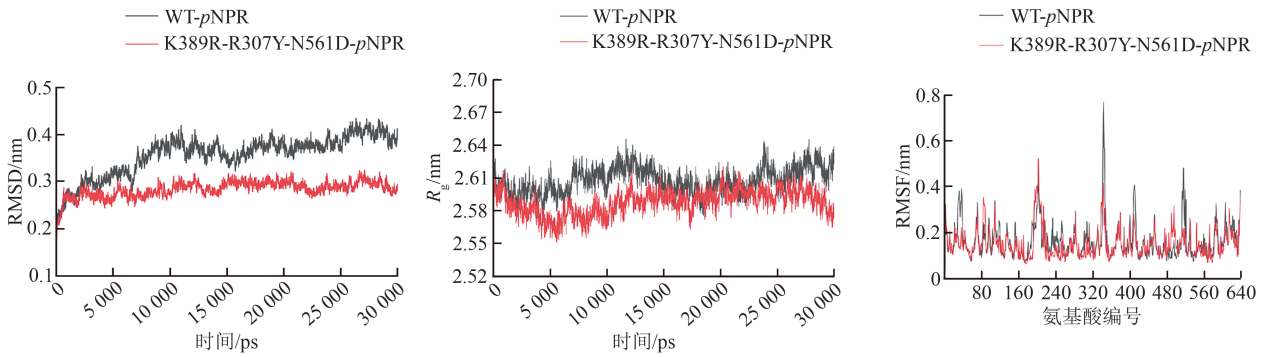
绿色虚线—氢键；浅绿色虚线—碳氢键。

图 5　WT 与 K389R-R307Y-N561D 的 RMSF、B-factor 值及差异细节图

Fig. 5　RMSF, B-factor value, and difference detailed plots between WT and K389R-R307Y-N561D

2.3.2　复合物体系的微观构象分析

复合物体系的RMSD、R_g及RMSF见图6。K389R-R307Y-N561D-*p*NPR体系比WT-*p*NPR体系更快达到平衡，且其R_g波动范围小于WT-*p*NPR体系，说明*p*NPR的加入使K389R-R307Y-N561D的蛋白质结构更稳定和紧密，呈现一定的刚性。K389R-R307Y-N561D突变体中4个区域RMSF明显下降，氨基酸刚性增强，说明*p*NPR可能与这些区域的氨基酸相互作用，进而限制氨基酸的摆动幅度，底物的加入增强了蛋白质结构的刚性，K389R-R307Y-N561D与*p*NPR结合更紧密，联合突变更利于酶在参与化学反应时保持结构稳定。



(a) 复合物体系的RMSD　(b) 复合物体系的R_g　(c) 复合物体系的RMSF

图6　WT、K389R-R307Y-N561D与*p*NPR复合物体系的RMSD、R_g和RMSF

Fig. 6　RMSD, R_g, and RMSF of the complex systems of WT and K389R-R307Y-N561D with *p*NPR

复合物体系的MM-PBSA计算结果见表4，氨基酸能量分解结果见图7。联合突变可增强酶与*p*NPR结合的范德华力、静电相互作用力和极性溶剂化能这类正向驱动力，提高酶对*p*NPR的亲和力。对比轨迹构象，突变后*p*NPR末端鼠李糖受到正向驱动力作用，相互作用更深且强度更大，利于糖苷键水解。ASP239因与鼠李糖形成多组强氢键，对结合*p*NPR贡献明显，以静电相互作用牵引*p*NPR至结合区域；同时也证明了对接结果中色氨酸的吲哚基团通过疏水相互作用固定鼠李糖，并由酸性氨基酸和碱性氨基酸在鼠李糖的底部形成“U”型极性包围圈，通过氢键牵引并稳定*p*NPR的结合构象。联合突变使范德华力、静电相互作用力和极性溶剂化能这类正向驱动力增强，酸性氨基酸和碱性氨基酸在*p*NPR末端形成“U”型极性包围圈，强化芳香族氨基酸的环状结构与*p*NPR形成疏水相互作用，促进联合突变体与*p*NPR的结合。

联合突变对蛋白质结构的影响主要体现在：增强了催化结构域上方Loop区的灵活度，促进底物进入并到达结合区域深处，但受催化结构域上方Loop区柔性增大、底部位点突变后产生局部扰动的影响，氢键网络、π-π堆叠作用受破坏导致桶状结构底部外层螺旋束稳定性降低（见图5）。构成K423R-R307Y-N561D的3个单点突变体分别在热稳定性（K389R）、pH稳定性（R307Y）和酶的活性（N561D）方面表现良好。单点突变体和联合突变体的性质与结构差异见表5，在设计联合突变体时，要避免突变位点间距离过近，却未充分考虑位点间的动态关联产生的负面影响。位点间存在

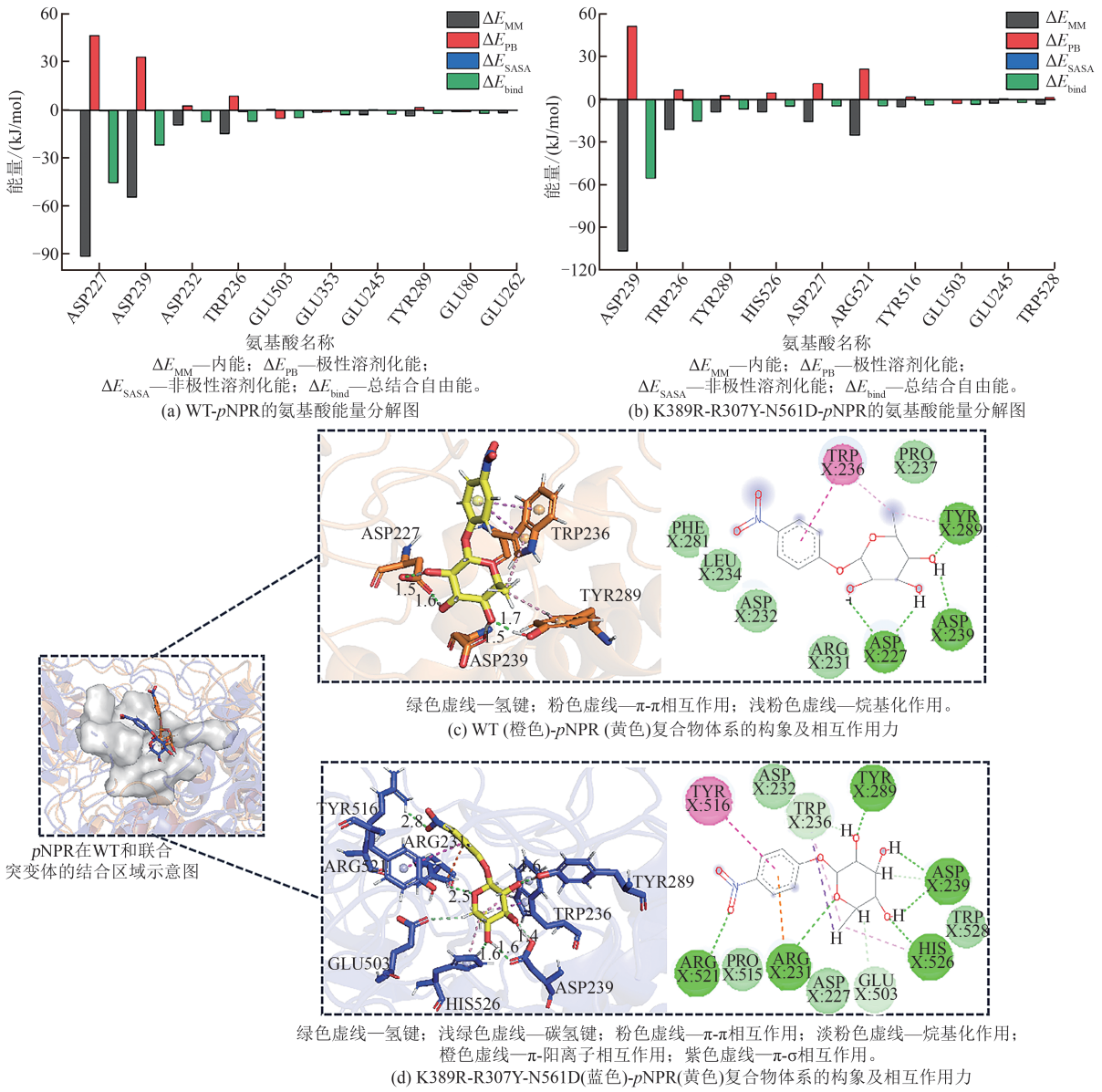
表4　WT、K389R-R307Y-N561D与*p*NPR复合物体系结合自由能

Table 4　Binding free energy of complex systems of WT and K389R-R307Y-N561D with *p*NPR

单位：kJ/mol

结合自由能贡献项	WT与*p*NPR复合物体系结合自由能	K389R-R307Y-N561D与*p*NPR复合物体系结合自由能
ΔE_{vdw}	−50.758	−87.561
ΔE_{elec}	−311.269	−339.398
ΔE_{PB}	166.810	213.515
ΔE_{SASA}	−10.380	−13.255
ΔE_{bind}	−205.598	−226.699

注：ΔE_{vdw}为酶与底物的范德华力；ΔE_{elec}为酶与底物的静电相互作用力；ΔE_{PB}为酶与底物的极性溶剂化能；ΔE_{SASA}为酶与底物的非极性溶剂化能；ΔE_{bind}为复合物体系总结合自由能。



ΔE_{MM}—内能；ΔE_{PB}—极性溶剂化能；
ΔE_{SASA}—非极性溶剂化能；ΔE_{bind}—总结合自由能。
(a) WT-*p*NPR的氨基酸能量分解图

ΔE_{MM}—内能；ΔE_{PB}—极性溶剂化能；
ΔE_{SASA}—非极性溶剂化能；ΔE_{bind}—总结合自由能。
(b) K389R-R307Y-N561D-*p*NPR的氨基酸能量分解图

绿色虚线—氢键；粉色虚线—π-π相互作用；浅粉色虚线—烷基化作用。
(c) WT (橙色)-*p*NPR (黄色)复合物体系的构象及相互作用力

绿色虚线—氢键；浅绿色虚线—碳氢键；粉色虚线—π-π相互作用；淡粉色虚线—烷基化作用；
橙色虚线—π-阳离子相互作用；紫色虚线—π-σ相互作用。
(d) K389R-R307Y-N561D(蓝色)-*p*NPR(黄色)复合物体系的构象及相互作用力

图 7　WT、K389R-R307Y-N561D 与 *p*NPR 的氨基酸能量分解图及轨迹构象

Fig. 7　Amino acid energy decomposition diagrams and trajectory conformations of the complex systems of WT and K389R-R307Y-N561D with *p*NPR

表 5　单点突变体与联合突变体的性质及结构差异

Table 5　Property and structural differences of single-point mutants and combined mutants compared with WT

突变体	酶学性质变化	微观结构变化
K389R	与 WT 相比，在 60、65、70 ℃的半衰期分别提高了 2.0 h、11.0 min 和 0.6 min	Lys 突变为 Arg 后亲水性增强，更易形成离子相互作用和正电网络
R307R	pH 8.0~12.0 条件下半衰期均有不同程度提升	突变位点 0.5 nm 内形成更多利于结构稳定性提高的氢键和疏水相互作用，结构刚性增强
N561D	突变体的酶活力比 WT 提高了 130%，K_m 值比 WT 降低了 5.2 mmol/L，催化速率(k_{cat}/K_m)比 WT 提高了 1.05 倍	远端突变导致$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域上方 Loop 区柔性增大
K389R-R307Y-N561D	联合突变体的酶活力是 WT 的 167.20%，但半衰期提升不明显，在 pH 7.0 时的半衰期比 WT 提高了 15.39 min，在 pH 8.0 时的半衰期没有提升	位点联合后 K389R 增强 0.4 nm 内的相互作用，但间接破坏了 1.0 nm 内形成的氢键网络；R307Y 在 0.5 nm 内没有形成更多相互作用；N561D 增强$(\alpha/\alpha)_6$桶状催化结构域上方 Loop 区运动幅度，通过结构域构象调整使催化结构域底部的柔性增大。

共进化关系等动态关联，使得蛋白质在结构和功能上仍维持稳定[22-24]，若打破位点间的相互作用，会触发位点性质改变，从而平衡突变对结构的影响[25-26]。

3 结论

作者构建了黑曲霉α-L-鼠李糖苷酶的联合突变体，筛选出相对性状较优的联合突变体K389R-R307Y-N561D，深入探讨了不同突变位点组合对酶催化活性、热稳定性和pH稳定性的影响。结果表明，K389R-R307Y-N561D的结构稳定性并没有与催化活性协同提升，说明影响突变效果的因素并非限制于突变位点间的空间距离。在多位点联合突变过程中，单位点的突变可能会对耦合程度高的位点产生影响，而位点间的动态关联，如相互作用引发的链式反应及共进化关系，对于维持蛋白质的结构和功能稳定性至关重要。对K389R-R307Y-N561D的分析未能充分考虑三点之间的微扰及动态平衡，触发了位点的补偿机制，导致酶活力与结构稳定性未能实现协同提升。这一结论的提出不仅丰富了联合突变体设计的理论基础，还为酶性能优化和蛋白质工程领域的研究提供了新的方向。未来的研究可综合考虑空间距离和动态关联来设计联合突变体，尤其注重突变位点间的动态关联。

参考文献

[1] LI L J, LI W J, GONG J Y, et al. An effective computational-screening strategy for simultaneously improving both catalytic activity and thermostability of α-L-rhamnosidase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2021, 118(9): 3409-3419.

[2] ALVARENGA A E, ROMERO C M, CASTRO G R. A novel α-L-rhamnosidase with potential applications in citrus juice industry and in winemaking [J]. European Food Research and Technology, 2013, 237(6): 977-985.

[3] PENG C, LI R, NI H, et al. The effects of α-L-rhamnosidase, β-D-glucosidase, and their combination on the quality of orange juice[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(7): e15604.

[4] LIU A L, HUANG B H, LEI L, et al. Production of high antioxidant activity flavonoid monoglucosides from citrus flavanone with immobilised α-L-rhamnosidase in one step [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(10): 2854-2862.

[5] NEHER B D, MAZZAFERRO L S, KOTIK M, et al. Bacteria as source of diglycosidase activity: *Actinoplanes missouriensis* produces 6-O-α-L-rhamnosyl-β-D-glucosidase active on flavonoids [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(7): 3061-3070.

[6] 叶家影，孙江，李文静，等. 山梨醇对黑曲霉源α-L-鼠李糖苷酶(r-Rha1)热稳定性的影响[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(10)：96-103.
YE J Y, SUN J, LI W J, et al. Effect of sorbitol on thermal stability of α-L-rhamnosidase (r-Rha1) from *Aspergillus niger* [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(10): 96-103.(in Chinese)

[7] GAO Q, MING D M. Protein-protein interactions enhance the thermal resilience of SpyRing-cyclized enzymes: a molecular dynamic simulation study[J]. PLoS One, 2022, 17(2): e0263792.

[8] YUAN B, ZHOU S Y, LIU C W, et al. Status of the application of exogenous enzyme technology for the development of natural plant resources [J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(3): 429-442.

[9] 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)

[10] WANG D Q, ZHENG P, CHEN P C, et al. Engineering an α-L-rhamnosidase from *Aspergillus niger* for efficient conversion of rutin substrate [J]. Biochemical Engineering Journal, 2022, 186: 108572.

[11] HUANG J J, HU H X, LU Y J, et al. Computer-aided design of α-L-rhamnosidase to increase the synthesis efficiency of icariside I[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 926829.

[12] 吴喆瑜. 定点突变提高黑曲霉α-L-鼠李糖苷酶r-Rha1的催化活性[D]. 厦门：集美大学，2018.

[13] SITTHIYOTHA T, KLAEWKLA M, KRUSONG K, et al. Computational design of *Lactobacillus acidophilus* α-L-rhamnosidase to increase its structural stability [J]. PLoS One, 2022, 17(5): e0268953.

[14] 杨岩. 基于理性设计的黑曲霉α-L-鼠李糖苷酶热稳定性改造的研究[D]. 厦门：集美大学，2017.

[15] 巩建业. 黑曲霉 *α-L*-鼠李糖苷酶活性架构的功能位点分析及pH稳定性改良[D]. 厦门:集美大学,2019.

[16] LU C N, DONG Y R, KE K X, et al. Modification to increase the thermostability and catalytic efficiency of *α-L*-rhamnosidase from *Bacteroides thetaiotaomicron* and high-level expression [J]. Enzyme and Microbial Technology,2022,158:110040.

[17] GE L, LI D D, WU T, et al. B-factor-saturation mutagenesis as a strategy to increase the thermostability of *α-L*-rhamnosidase from *Aspergillus terreus*[J]. Journal of Biotechnology,2018,275:17-23.

[18] 刘小琴,杨岩,吴喆瑜,等. 多点突变提高 *α-L*-鼠李糖苷酶热稳定性[J]. 食品与发酵工业,2019,45(6):23-29.
LIU X Q, YANG Y, WU Z Y, et al. Enhanced thermostability of *α-L*-rhamnosidase by multiple-site mutation[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(6):23-29.(in Chinese)

[19] 李高庭. 影响白曲霉 *α-L*-鼠李糖苷酶酶活力的结构特性研究[D]. 福建:集美大学,2017.

[20] VOGT G, WOELL S, ARGOS P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs[J]. Journal of Molecular Biology,1997,269(4):631-643.

[21] WANG Q Y, XIE N Z, DU Q S, et al. Active hydrogen bond network (AHBN) and applications for improvement of thermal stability and pH-sensitivity of pullulanase from *Bacillus naganoensis* [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169080.

[22] 乔孟春. 蛋白质序列共进化与自由态和结合态结构关系研究[D]. 武汉:华中科技大学,2021.

[23] 何淼,林强乾,赵艳超,等. 甲型流感病毒PB1-PA蛋白作用位点的发现与分析[J]. 中山大学学报(自然科学版),2011,50(2):81-86.
HE M, LIN Q Q, ZHAO Y C, et al. Discovery and analysis of protein-protein interaction sites of PB1-PA nuclease complex of influenza a virus [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2011, 50(2):81-86.(in Chinese)

[24] WANG J, MAO K K, ZHAO Y J, et al. Optimization of RNA 3D structure prediction using evolutionary restraints of nucleotide-nucleotide interactions from direct coupling analysis[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(11): 6299-6309.

[25] BURGER L, VAN NIMWEGEN E. Disentangling direct from indirect co-evolution of residues in protein alignments [J]. PLoS Computational Biology, 2010, 6(1):e1000633.

[26] DONG F Y, ZHANG M, MA R, et al. Insights of conformational dynamics on catalytic activity in the computational stability design of *Bacillus subtilis* LipA [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2022,722:109196.

(责任编辑:闫林红)