

C 端柔性区域对多糖降解菌来源的 麦芽五糖生成酶冷适性的调控

丁宁¹, 李才明^{1,2,3}, 班宵逢^{1,2,3}, 顾正彪^{*1,2,3}, 李兆丰^{*1,2,3}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏无锡 214122; 3. 江南大学食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏无锡 214122)

摘要: 冷适麦芽五糖生成酶在低温下具有较高的催化活力, 同时能够在室温下快速水解淀粉并特异性地生成具有营养功效的麦芽五糖, 因此在食品、医药等领域具有广阔的应用前景。作者以来源于 *Saccharophagus degradans* 的两种麦芽五糖生成酶(SdG5A 和 SdG5A-CD)为研究对象, 将其分别表达于 *Bacillus subtilis* 中, 并分析比较了重组酶的冷适性。结果表明, 重组 SdG5A 在 0 °C 下可以保持 27.8% 的酶活力, 在室温下生产麦芽五糖的得率高达 48.6%, 具有较强的冷适性; 而不含有 linker 和淀粉结合域(SBD)的 SdG5A-CD 不具有冷适性。为了探究 SdG5A 的冷适性机理, 利用 RoseTTAFold 构建了结构模型, 并利用分子动力学模拟等方法分析了结构柔性。结果表明, 位于 SdG5A C 端的 linker-SBD 区域具有极高的柔性, 且在 0 °C 下的均方根涨落与 45 °C 保持一致, 说明 linker-SBD 结构高柔性的分子特征是影响 SdG5A 冷适性的关键因素。

关键词: 麦芽五糖生成酶; 冷适性; 柔性; 分子动力学模拟; 淀粉结合域

中图分类号: Q 556.2 文章编号: 1673-1689(2022)10-0067-10 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.10.006

Modulation of Cold Adaptation of *Saccharophagus degradans* Maltopentaose-Forming Amylase via Its C-Terminal Flexible Region

DING Ning¹, LI Caiming^{1,2,3}, BAN Xiaofeng^{1,2,3}, GU Zhengbiao^{*1,2,3}, LI Zhaofeng^{*1,2,3}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Collaborative Innovation Center for Food Safety and Quality Control, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Cold-adapted maltopentaose-forming amylases have relatively high catalytic activities at low temperatures and enable an efficient and specific conversion of starch to functional maltopentaose at room temperature, resulting in a broad applications in food, medical and pharmaceutical fields. In this study, SdG5A and SdG5A-CD from *Saccharophagus degradans* were expressed in *Bacillus subtilis*. Further, the cold adaptation of the recombinant enzymes was characterized and compared. The results showed that recombinant SdG5A retained 27.8% of its

收稿日期: 2022-04-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901901)。

* 通信作者: 李兆丰(1979—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事淀粉生物技术方面的研究。E-mail: zfli@jiangnan.edu.cn

顾正彪(1965—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事淀粉科学与工程方面的研究。

E-mail: zhengbiaogu@jiangnan.edu.cn

maximal activity at 0 °C and could produce 48.6% of maltopentaose at room temperature, indicating a strong cold adaptation of SdG5A. In contrast, SdG5A-CD, lacking the linker and starch-binding domain (SBD), did not show any cold adaptation. To investigate the mechanisms that might underlie the cold adaptation of SdG5A, the structure was predicted by RoseTTAFold and the structural flexibility was analyzed through molecular dynamics simulation. An extremely high flexibility in the C-terminal linker-SBD region was observed and its root-mean-square fluctuation at 0 °C was consistent with that at 45 °C, indicating that the highly flexible linker-SBD region acted as a critical component for the cold adaptation of SdG5A.

Keywords: maltopentaose-forming amylase, cold adaptation, flexibility, molecular dynamics simulation, starch-binding domain

地球的自然生态系统中存在诸多极端环境,能够在极端环境下正常生长代谢的微生物被称为极端微生物,其中,在海洋深处、极地和陆地高寒带等低温环境生长的微生物被称为低温微生物。低温微生物通常具有与常温微生物不同的生理机制,其中包括分泌的酶类具有较强的低温催化能力,这类酶被称为冷适酶^[1-2]。对冷适酶进行研究,一方面能够拓宽酶的应用范围,一定程度上填补工业用酶的缺口;另一方面,冷适酶的分子结构通常具有特殊性,因此,发现并总结冷适酶的结构与功能关系,可以为生物学研究提供宝贵信息^[3-4]。

麦芽五糖(maltopentaose, G5)是由5个葡萄糖单元以 α -1,4糖苷键连接而成的低聚糖,因其甜度较低,在维持血糖平衡和改善肠道内环境中发挥重要作用,同时作为营养助剂和诊断试剂被广泛应用于食品和医药领域,因此G5的合成具有较高的研究和应用价值^[5-8]。G5主要采用酶法生产,即利用麦芽五糖生成酶(maltopentaose-forming amylase, G5A, EC 3.2.1.X)选择性地水解淀粉中特定的 α -1,4糖苷键,生成以G5为主的麦芽低聚糖混合物。目前,已报道的G5A的最适反应温度为60~93 °C^[9-11],在室温或低温下催化效率极低。然而,长时间加热可能引起G5的颜色等物理性质发生变化,并且降低G5的营养性^[12];同时,高温生产会引起大量能源消耗和温室气体排放。因此,冷适G5A的开发对于高效、绿色生产高品质的G5起到至关重要的作用^[9]。

前期研究表明,海洋微生物多糖降解菌*Saccharophagus degradans*能够分泌两种不同相对分子质量的G5As (SdG5A和SdG5A-CD),位于

SdG5A C端的淀粉结合域(starch-binding domain, SBD)可能发生降解,形成SdG5A-CD。为了探究SdG5A和SdG5A-CD的冷适性,作者分别将其表达于枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* WB600中,并对重组SdG5A和重组SdG5A-CD进行分离纯化。以水解活力和G5得率为指标,分析其在低温下的催化能力。随后,利用RoseTTAFold预测SdG5A的结构模型,并在此基础上通过结构分析和分子动力学模拟(molecular dynamics simulations, MD)等生物信息学手段,阐明SdG5A分子柔性与其冷适性之间的关系。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 质粒和菌株 pST质粒、*Escherichia coli* JM109克隆菌株保存于作者所在实验室;*B. subtilis* WB600感受态细胞由江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心馈赠。

1.1.2 主要试剂与材料 高保真DNA聚合酶Phanta Max、重组克隆试剂盒:南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;Phenyl Superose HR 10/10疏水柱:美国Amersham Biosciences公司产品;Superdex 75 10/300凝胶柱:瑞典GE Healthcare Biosciences公司产品;CarboPac™ PA200碳水化合物分析柱:美国Dionex公司产品;麦芽低聚糖标准品:日本Hayashibara生物化学研究所提供。

1.1.3 主要仪器 AKTA Prime Plus蛋白质纯化系统:美国GE公司产品;高效阴离子交换色谱(high-performance anion-exchange chromatographic, HPAEC)仪、脉冲电流检测器(pulsed amperometry

detector, PAD): 美国 Thermo Scientific 公司产品。

1.1.4 培养基 LB 培养基: 胰蛋白酶 10 g/L、酵母粉 5 g/L、氯化钠 10 g/L, pH 7.0; 固体培养基再添加 1.5 g/dL 琼脂粉。发酵培养基: 酵母粉 36 g/L、麦芽糊精 5 g/L, pH 6.0。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体 *sdg5a/pST* 和 *sdg5a-cd/pST* 的构建 SdG5A 编码基因 *sdg5a* (GenBank accession: AIV43244.1) 和相关引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。利用聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增 *sdg5a*、*sdg5a-cd* 和 pST 质粒基因片段, 引物序列见表 1。

表 1 构建 *sdg5a/pST* 和 *sdg5a-cd/pST* 表达载体的引物设计

Table 1 Primers used for the construction of *sdg5a/pST* and *sdg5a-cd/pST* plasmid

载体	模板	引物序列(5'—3')
<i>sdg5a/pST</i>	<i>sdg5a</i>	tttcagccctgccaggcccatcatcatcatcacCAACCGGAACCGCGTTC
	<i>sdg5a</i>	AAAGCTTCCCCGTGGGTACG
	pST 质粒基因	cgtaccaacgggaagcttTAAGGCGTGAGGGATAGGCC
	pST 质粒基因	GGCCTGGGCAGGGCTGAA
	<i>sdg5a</i>	tttcagccctgccaggcccatcatcatcatcacCAACCGGAACCGCGTTC
<i>sdg5a-cd/pST</i>	<i>sdg5a</i>	AGCGCTACATGAATTGCGG
	pST 质粒基因	ccgcaattcatgtaggectTAAGGCGTGAGGGATAGGCC
	pST 质粒基因	GGCCTGGGCAGGGCTGAA

PCR 完成后, 分别在两个基因片段中加入 1 μL 限制性内切酶 *Dpn* I, 于 37 °C 酶切 4 h, 消化模板质粒, 并进行切胶回收。参考重组克隆试剂盒说明书, 完成片段的拼接, 得到 *sdg5a/pST* 和 *sdg5a-cd/pST* 表达载体。

1.2.2 *Bacillus subtilis* WB600 感受态细胞的转化 取 10 μL *sdg5a/pST* 和 *sdg5a-cd/pST* 质粒, 分别加入至 *B. subtilis* WB600 超级感受态细胞 (100 μL) 中, 于 37 °C 摇床 (200 r/min) 中培养 2 h, 涂布于含有终质量浓度 10 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基, 37 °C 培养过夜。挑取单菌落即为基因工程菌 *sdg5a/pST/B. subtilis* WB600 和 *sdg5a-cd/pST/B. subtilis* WB600。

1.2.3 SdG5A 和 SdG5A-CD 的生产和纯化 挑取单菌落加入到装有 5 mL LB 培养基的 15 mL 聚丙烯圆底试管中, 于 37 °C 摇床 (200 r/min) 过夜培养。取 2 mL 活化菌液接种至含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在 25 °C 摇床 (200 r/min) 培养 72 h。发酵结束后, 将发酵液在 4 °C、10 000 r/min 的条件下离心 20 min, 收集上清液即为重组 SdG5A 和 SdG5A-CD 粗酶液。LB 培养基和发酵培养基中均添加终质量浓度为 10 μg/mL 的卡那霉素。

重组 SdG5A 和 SdG5A-CD 的纯化均采用疏水柱与凝胶柱相结合的方法。在使用疏水柱纯化时, 首先用含有体积分数为 20% (NH₄)₂SO₄ 的缓冲液 A

(20 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0) 平衡疏水柱, 上样后, 分别用体积分数 0~100% 的缓冲液 A (与超纯水混合) 进行梯度洗脱, 并最终用超纯水洗脱活性组分用于凝胶柱二步纯化。在使用凝胶柱纯化时, 同样用缓冲液 A 平衡凝胶柱, 并在上样后用超纯水洗脱, 收集洗脱液的活性部分即为纯化重组 SdG5A 和 SdG5A-CD。将纯酶液置于 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中, 于 4 °C 下透析过夜, 并将纯酶分装保存于 -80 °C 中。

1.2.4 水解活力的测定 将每分钟生成 1 μmol 还原糖 (以葡萄糖计) 所需的酶量定义为 1 个酶活力单位 (U)。还原糖的含量利用 3,5-二硝基水杨酸法测定^[13]。具体方法为用 C₆H₈O₇-Na₂HPO₄ 缓冲液 (50 mmol/L, pH 6.5) 配制 1 g/dL 的可溶性淀粉溶液, 加热糊化。取 900 μL 底物加入 100 μL 适当稀释的酶液, 分别于 0、25、45 °C 下反应 15 min 后, 加入 1 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂。在沸水浴中显色 5 min, 冷却后加入 3 mL 蒸馏水, 在 540 nm 下测定吸光度。

1.2.5 水解产物分析 配置 10 g/dL 的蜡质玉米淀粉作为底物, 分别加入 2 U/g 重组 SdG5A 和 SdG5A-CD, 在 25 °C 下反应 48 h, 每隔 12 h 取样, 沸水浴 30 min 终止反应, 离心 (10 000 r/min) 5 min, 取上清液过 0.22 μm 水系超滤膜待测。利用 HPAEC-PAD 分析产物中各组分含量^[6]。采用三元梯

度程序进行洗脱 (见表 2), 其中洗脱液 A 为 0.25 mol/L 氢氧化钠, 洗脱液 B 为 1.0 mol/L 醋酸钠, 洗脱液 C 为超纯水。流量为 0.5 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μ L, 以糖四电位波形检测。

表 2 HPAEC-PAD 分离麦芽低聚糖的梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program for the separation of maltooligosaccharides using HPAEC-PAD

时间/min	洗脱液 A 体积分数/%	洗脱液 B 体积分数/%	洗脱液 C 体积分数/%
0~6.0	8	2	90
6.0~6.5	8~12	2~4	90~84
6.5~18.0	12~24	4~8	84~68
18.0~25.0	24	6~36	68~40
25.0~40.0	24	36	40
40.0~50.0	8	2	90

以葡萄糖、麦芽糖和麦芽低聚糖标准品为对照进行水解产物组分的定性和定量, 淀粉转化率和 G5 比例的计算方法如下:

$$C_s = m_1/m_0 \times 100\% \quad (1)$$

$$R_{G5} = m_{G5}/m_1 \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_s 为淀粉转化率, %; m_1 为葡萄糖、麦芽糖、麦芽低聚糖总质量; m_0 为底物干基质量; R_{G5} 为 G5 比例, %; m_{G5} 为 G5 质量。

1.2.6 SdG5A 的结构预测 利用 RoseTTAFold (<https://rosetta.bakerlab.org/>)^[14]和 AlphaFold2^[15]模拟 SdG5A 的空间结构。利用 M-ZDock (<https://zdock.umassmed.edu/m-zdock/>)模拟 SdG5A 二聚体结构^[16]。模拟结构的准确性和相似性利用 ResQ (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ResQ/>)计算 TM-score 进行评价^[17]。蛋白质结构作图利用 Pymol 软件进行。**1.2.7 SdG5A 的柔性分析** 利用 ResQ 在线分析工具 (<https://zhanggroup.org/ResQ/>)分析 SdG5A 的温度因子 (B-factor) 和模型到自然态之间的距离 (distance to native state, d_n), 并以此作为评价蛋白质静态柔性的依据^[17]。利用 MD 计算 SdG5A 在不同温度下氨基酸残基的均方根涨落 (root-mean-square fluctuation, RMSF) 值, 以此作为评价 SdG5A 动态柔性的指标。

利用 Desmond 软件进行 MD, 溶剂模型选择 TIP3P, 盒子为正交晶系, 盒子大小设置为 1 nm \times 1 nm \times 1 nm, 角度 $\alpha=90^\circ$ 、 $\beta=90^\circ$ 、 $\chi=90^\circ$ 。添加 Na⁺平衡电荷, 选择 OPLS4 力场进行体系构建。选择 NVT 平衡, 温度设置为 0 °C 和 45 °C, 每个体系的模拟时间

为 100 ns, 收集 1 000 帧轨迹。

1.2.8 数据处理 实验结果为 3 次平行实验的平均值, 采用平均值 \pm 标准偏差表示。利用 Prism 8 Student's *T*-test 分析两组间的显著性差异。当 $P < 0.05$ 时, 认为组间差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 Linker-SBD 对 SdG5A 冷适性的影响

2.1.1 SdG5A 和 SdG5A-CD 的纯化 SdG5A 与 SdG5A-CD 含有相同的催化域 (Q1~A427), SdG5A 在 C 端含有额外的 SBD (V446~F542), 位于 N 端的催化域与 C 端的 SBD 之间以 linker (I428~K445) 连接 (见图 1(a))。SdG5A 和 SdG5A-CD 的理论相对分子质量分别为 58 000 和 48 000。重组 SdG5A 和 SdG5A-CD 均采用疏水-凝胶两步法进行纯化, 经十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 验证, 所收集活性部分的相对分子质量与理论相对分子质量相同 (见图 1(b))。

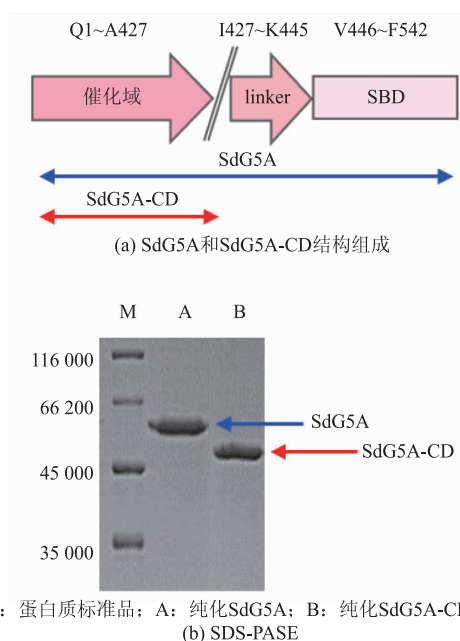


图 1 SdG5A 和 SdG5A-CD 的结构组成和 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 Structural composition and SDS-PAGE analysis of SdG5A and SdG5A-CD

2.1.2 SdG5A 和 SdG5A-CD 的冷适性 为了评价 SdG5A 和 SdG5A-CD 的冷适性, 分别测定了其在冰点 (0 °C)、室温 (25 °C) 和最适反应温度 (45 °C) 下的水解活力, 结果如表 3 所示, SdG5A 在 0 °C 和 25 °C

下可分别保持最高比活力 27.8%和 64.0%的水解活力,说明其具有较强的冷适性;而 SdG5A-CD 在 0 °C 下的比活力仅为野生型的 2.7%,在 25 °C 下的比活力仅为 45 °C 下的 26.7%,说明 linker-SBD 结构的缺失导致 SdG5A 的冷适性大幅下降。来源于盐浮交替单胞菌 (*Alteromonas haloplanctis*) A23 的 α -淀粉酶 (AHA) 是最早发现、目前研究最多的冷适 α -淀粉酶,其最适温度为 25 °C,在 0 °C 下的催化活力为最适温度下 20%^[18]。与 AHA 相比,SdG5A 在 0 °C 下的相对活力高于 AHA,说明其具有良好的应用前景。

表 3 SdG5A 和 SdG5A-CD 在不同温度下的比活力

Table 3 Specific activities of SdG5A and SdG5A-CD oct different temperature

酶	比活力/(U/mg)		
	0 °C	25 °C	45 °C
SdG5A	59.8±5.4 ^a	137.5±5.6 ^a	214.9±6.3 ^a
SdG5A-CD	1.6±0.2 ^b	15.2±0.9 ^b	57.0±2.3 ^b

注:表中数据表示为平均值±标准差(n=3),同列标注不同字母的数值之间具有显著性差异(P<0.05)。

为了探究 SdG5A 和 SdG5A-CD 在室温下制备 G5 的效率,评价其应用可行性,以 10 g/dL 的蜡质玉米淀粉为底物,在 25 °C 下反应 0~48 h,利用 HPAEC-PAD 分析水解产物,并计算淀粉转化率和 G5 比例,结果如图 2 所示。结果表明,当 SdG5A 与蜡质玉米淀粉反应 24 h 时,G5 得率 (G5 比例与淀粉转化率的乘积)高达 48.6%;然而当反应时间延长至 48 h 时,由于 SdG5A 发生了过度水解反应,产物中的 G5 被进一步降解为聚合度更低的小分子糖,导致 G5 得率降低 (见图 2 (a))。相比之下,由于 SdG5A-CD 在 25 °C 下的水解活力较低,并且产物特异性较差,其水解蜡质玉米淀粉生产 G5 的最高得率仅为 SdG5A 的 9.5%,因此,SdG5A 在室温下制备 G5 的效率更高。此前,韩煦利用巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 来源的 G5A 突变体水解 20 g/dL 的木薯淀粉,在 40 °C 下反应 36 h,可以获得的最高 G5 得率为 39.0%^[19]。相比而言,利用 SdG5A 制备 G5 不仅得率更高,同时反应在室温下进行,能够降低加热和冷却处理所引起的对产品 and 环境的不利影响,因此,SdG5A 更适合用于 G5 的高效、绿色生产。

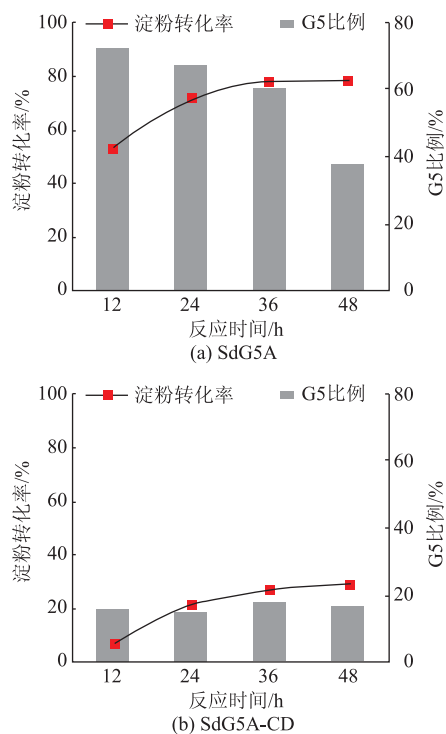


图 2 SdG5A 和 SdG5A-CD 在 25 °C 下水解蜡质玉米淀粉生产 G5 的淀粉转化率和 G5 比例

Fig. 2 Conversion rate and ratio of G5 arising from the hydrolyzation of waxy corn starch at 25 °C by SdG5A and SdG5A-CD

2.2 SdG5A 的空间结构

相比于 SdG5A-CD,SdG5A 具有较强的冷适性,说明 SdG5A 的 linker-SBD 结构对调控其冷适性具有重要作用。为了加深对 SdG5A 冷适性机制的理解,需要进一步获取其结构信息。然而,目前对 SdG5A 晶体结构的获取难度较大。一方面,SdG5A 与已报道的蛋白质的同源性均较低,这使其无法通过同源模型化的方法对结构进行解析和预测。在已报道序列的蛋白质中,SdG5A 与来源于海洋微生物 *Marinagarivorans algicola* 的淀粉酶 (GenBank accession WP_053982064) 同源性最高,序列相似度为 67%^[6];在已报道晶体结构的蛋白质中,SdG5A 与来源于 *Pseudoalteromonas haloplanktis* 的淀粉酶 (PDB ID:1G9H) 的同源性最高,序列相似度为 51%,但该酶不存在 SBD 结构,因此无法为 SdG5A 完整结构的解析和预测提供依据。另一方面,由于 SBD 的柔性过大,在溶液中呈高度无序性,且结构不稳定,在蛋白质结晶过程中易发生降解,导致包括 SdG5A 在内的麦芽低聚糖生成酶均无法通过 X

射线衍射的方法获得含有 SBD 的完整结构信息^[20-21]。2021 年 7 月, 谷歌 Deepmind 团队和华盛顿大学 David Baker 团队分别发布了新型蛋白质结构预测工具 AlphaFold2 和 RoseTTAFold^[14-15], 该成果突破性地提高了蛋白质结构预测的准确性, 同时也为本研究中获得 SdG5A 完整结构提供重要工具。

分别利用 RoseTTAFold 和 AlphaFold2 对 SdG5A 的空间结构进行预测, 结果如图 3 所示。利用 ResQ 计算单一结构的 TM-score, 可评价模拟结构的准确性, 在 0~1.00 时, 分值越高说明模拟结构越准确^[17]。RoseTTAFold 和 AlphaFold2 模拟的 SdG5A 结构的 TM-score 分别为 0.71 和 0.65, 说明 RoseTTAFold 模拟结构的准确性略高于 AlphaFold2。利用 ResQ 同时计算两个结构的 TM-score, 可评价两个结构的相似性, 若分值在 0.50~1.00 说明其具有相同的折叠方式^[17]。RoseTTAFold 与 AlphaFold2 模拟结构的 TM-score 为 0.78, 说明二者的相似度较高。尽管利用 RoseTTAFold 和 AlphaFold2 模拟得到的 SdG5A 结构中结构域内部的折叠基本相同, 但 SBD 的空间位置却明显不同 (见图 3)。在 RoseTTAFold 模拟结构中, 结构域的排列方式较为紧凑, SBD 与催化位点相靠近; 而在 AlphaFold2 模拟结构中, 结构域的排列方式较为松散, SBD 远离催化位点。

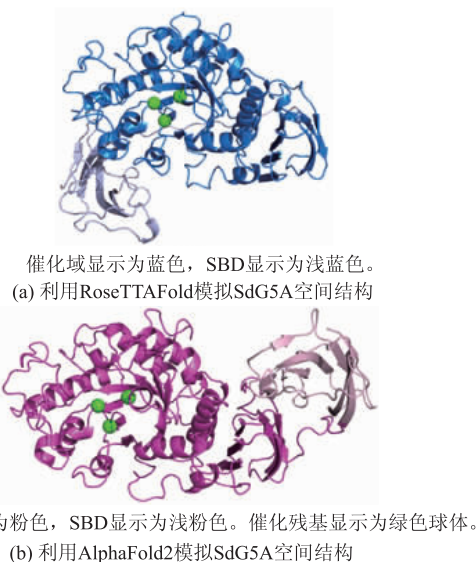


图 3 SdG5A 空间结构的预测

Fig. 3 Prediction of SdG5A spatial structures

为了明确 SBD 的位置, 分析了两个模拟结构中结构域之间的相互作用 (见图 4)。结果表明, 在

AlphaFold2 模拟结构中, SBD 与催化域之间不存在相互作用; 但在 RoseTTAFold 模拟结构中, 催化域、linker 和 SBD 之间存在大量氢键相互作用, 这些作用力使得 RoseTTAFold 模拟结构的整体构象更加紧凑, 有利于 SBD 发挥向催化域递送底物的作用^[22]。

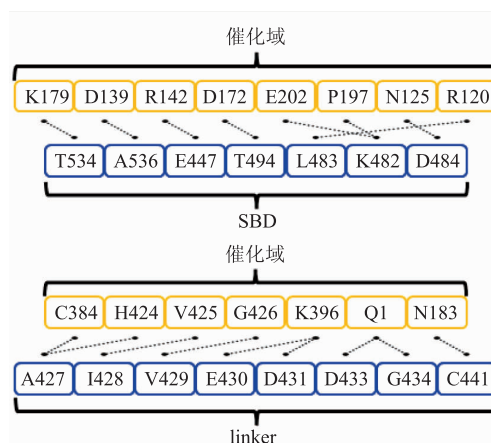


图 4 RoseTTAFold 模拟结构中催化域、SBD 和 linker 之间的相互作用力

Fig. 4 Schematic diagram of the interactions within catalytic domain, SBD and linker in the structure predicted by RoseTTAFold

SdG5A 的表面电荷分析结果表明, 其催化域中的碱性氨基酸残基的比例高于酸性氨基酸残基, 使其整体带正电荷, 净电荷密度 (碱性氨基酸残基数目与酸性氨基酸残基数目的差值占总氨基酸残基数目的比例) 为 +6.1%; 而在 SBD 中, 酸性氨基酸残基的比例高于碱性氨基酸残基, 使其整体带负电荷, 净电荷密度为 -4.1%^[6]。由于催化域和 SBD 带相反电荷, 因此存在一定的静电引力, 这可能是 RoseTTAFold 模拟结构中催化域与 SBD 互相靠近的另一个原因。但氢键具有方向性, 而静电力不具有方向性, 因此, 产生这种构象的主要原因仍然是催化域与 SBD 之间的氢键相互作用。

Jorgensen 等利用小角衍射观察到 *Aspergillus niger* 葡萄糖淀粉酶 (glucoamylase, EC 3.2.1.3) 可以在溶液中形成“头对尾”的二聚体结构, 这种结构可以促使 SBD 向催化域靠近, 而不必依赖于 linker 的运动调整催化域和 SBD 的相对位置^[23]。相应地, 对于整体构象较为松散的 AlphaFold2 模拟结构, 也可能通过形成二聚体获得更加紧凑的构象, 从而使 SBD 靠近催化位点。以 AlphaFold2 模拟的 SdG5A

结构(见图3(b))为模板,利用M-ZDock模拟SdG5A的二聚体结构。由图5(a)中可以看出,SdG5A的二聚体同样呈现出“头对尾”的结构,其中一个单体的SBD靠近于另一个单体的催化位点。将该二聚体结构与RoseTTAFold模拟结构叠加,发现后者的SBD与前者其中一个单体的SBD的位置接近(见图5(b))。该结果说明,RoseTTAFold和AlphaFold2所模拟的SdG5A结构均可被认为是准确的,二者的区别在于RoseTTAFold所模拟的是SdG5A呈单体时的构象,而AlphaFold2所模拟的是SdG5A呈二聚体时的构象。

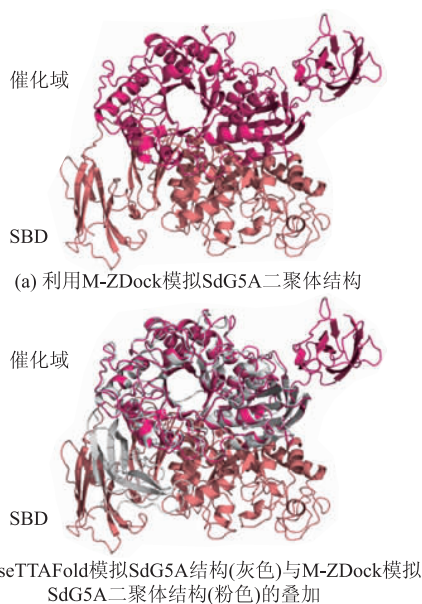


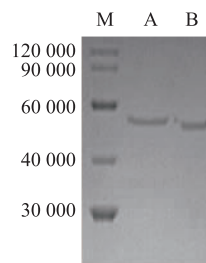
图5 SdG5A二聚体空间结构的预测

Fig. 5 Structure prediction of dimeric SdG5A

为了判断SdG5A形成二聚体的可能性,分别利用Native-PAGE和SDS-PAGE分析SdG5A在非变性和变性条件下的相对分子质量(见图6),结果表明,两种方法测得的SdG5A相对分子质量一致,说明SdG5A在溶液中以单体形式存在,因此,RoseTTAFold模拟的SdG5A结构更加准确。

为了进一步验证RoseTTAFold模拟结构的准确性,以来源于嗜热脂肪芽孢杆菌(*B. stearothermophilus*)的麦芽糖 α -淀粉酶(maltogenic α -amylase, EC 3.2.1.133, BstA)的晶体结构(PDB ID: 1QHP)为参考结构^[24],与SdG5A模拟结构进行比对。一方面,BstA的功能与SdG5A相似,二者均能够水解淀粉的 α -1,4糖苷键,特异性地生成某一

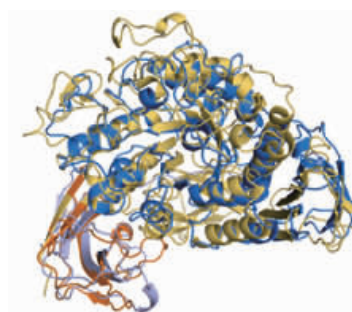
种聚合度的产物;另一方面,BstA的结构组成与SdG5A相似,二者在C端均含有SBD。通过叠加SdG5A模拟结构与BstA晶体结构发现,两个结构中SBD的位置几乎完全相同(见图7),说明RoseTTAFold模拟结构的可信度较高。



M:蛋白质标准品;A:变性SdG5A;B:非变性SdG5A。

图6 SdG5A的变性电泳与非变性电泳分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Native-PAGE analysis of SdG5A



RoseTTAFold模拟SdG5A结构的催化域显示为蓝色,SBD显示为浅蓝色;BstA晶体结构的催化域显示为黄色,SBD显示为橙色。

图7 SdG5A模拟结构与BstA晶体结构的比对

Fig. 7 Alignment of the predicted structure of SdG5A and the crystal structure BstA

2.3 SdG5A的柔性分析

在低温条件下,蛋白质的分子热运动较低,不利于酶对底物分子的获取。因此,通过提高蛋白质的整体或局部柔性来增强分子热运动,可以有效提高冷适酶在低温下的催化效率。蛋白质柔性可以通过B-factor、 d_n 和RMSF进行评价,其中,B-factor是衡量原子位置不确定性的一种指标,反映了晶体中原子电子密度的模糊度^[25]; d_n 是衡量原子不稳定性的一种指标,当原子处于能量最低、最稳定的自然态时, d_n 数值为0^[17];RMSF是衡量原子运动自由度的指标,可以利用MD计算一定时间范围内每个原子相对于其平均位置的变化幅度而获得。B-factor和 d_n 反映的是蛋白质结构的静态柔性,而RMSF反

映的是动态柔性。B-factor、 d_n 和 RMSF 的数值越大,说明相应区域的柔性越高。

2.3.1 SdG5A 的静态柔性 利用 ResQ 分析 SdG5A 的静态柔性,包括 B-factor(见图 8(a))和 d_n (见图 8(b)),并利用 Pymol 将 SdG5A 的 B-factor 映射到其空间结构(见图 8(c))。

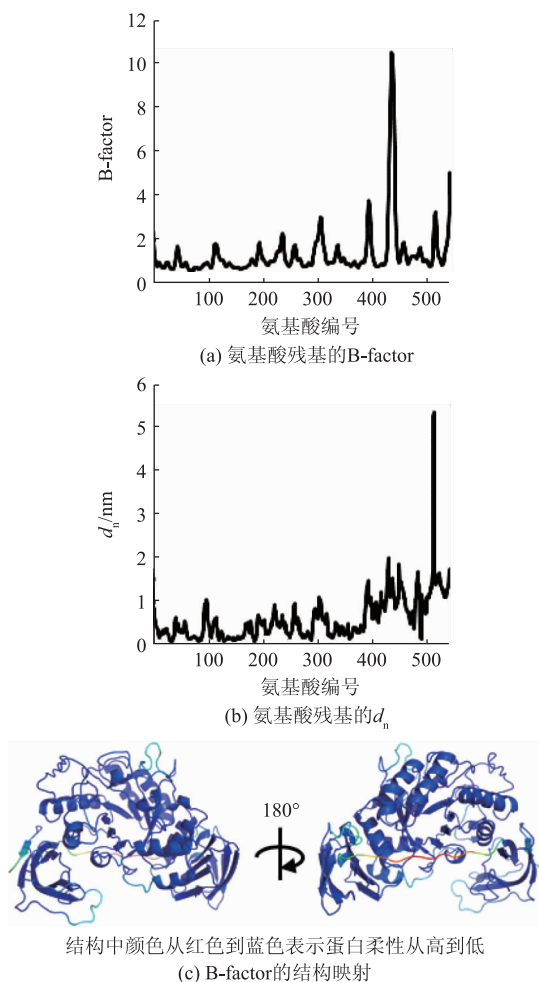


图 8 SdG5A 的静态柔性分析

Fig. 8 Analysis of the static flexibility of SdG5A

由图 8 (a) 和图 8 (c) 可知,linker 区域的 B-factor 值明显高于催化域和 SBD;从图 8(b)可知,linker 和 SBD 区域的 d_n 值均高于催化域,说明 linker 中原子位置的不确定性导致了 linker-SBD 区域中原子位置的不稳定性,即高度灵活的 linker 可能带动了 SBD 的运动。

2.3.2 SdG5A 的动态柔性 在 0 °C 和 45 °C 下分别运行 MD,当体系运行至 100 ns 后,蛋白质分子的均方根偏差介于 0.5~0.6 nm,说明此时 SdG5A 结构趋于稳定。SdG5A 的 RMSF 曲线如图 9(a)所示。结果

表明,在 45 °C 下蛋白质整体结构柔性较高;当温度降低至 0 °C 时,催化域中的氨基酸残基的 RMSF 发生不同程度的降低,而 linker-SBD 区域 RMSF 未发生明显变化,说明 linker-SBD 区域的柔性受温度影响较小,且在 0 °C 下仍然能够保持较高的柔性。比较 0 °C 下不同时刻 SdG5A 的整体构象发现,催化域的中心结构域在 100 ns 内未发生明显位移,而 SBD 可以在较大的空间范围内摆动(见图 9(b))。考虑到 SBD 具有捕获底物的能力^[2],linker-SBD 结构高柔性的分子特征有利于提高其在低温下捕获底物的效率,从而提高酶的催化活力。以上结果阐明了 SdG5A 和 SdG5A-CD 的冷适性存在差异的原因,并揭示了调控 SdG5A 冷适性的重要结构基础。

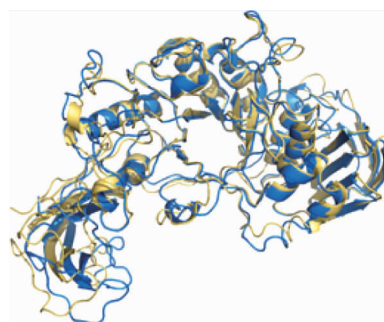
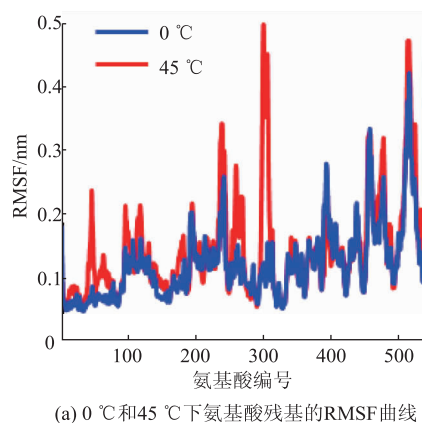


图 9 MD 分析 SdG5A 的动态柔性

Fig. 9 MD analysis of the dynamic flexibility of SdG5A

3 结语

目前已报道的 G5A 均为高温酶,为了维持其酶反应体系的温度,需要消耗大量的能源、排放大量的温室气体,并且产品的营养价值和感官品质会受到高温的影响而降低。为了解决上述问题,一方面

可以加强对冷适 G5A 的开发和应用;另一方面可以挖掘和总结冷适 G5A 的结构特征,对非冷适 G5A 进行定向改造。为了实现上述目标,作者以 SdG5A 和 SdG5A-CD 为研究对象,通过异源表达体系的构建、冷适性的表征、空间结构的模拟和分子柔性的

分析,证明了 SdG5A 在室温下生产 G5 的可行性,并揭示了 linker-SBD 结构高柔性的分子特征对调控酶冷适性的关键作用,可为其他淀粉酶分子改造的理性设计提供参考,为 G5 的高效、绿色合成提供理论基础。

参考文献:

- [1] JIN M, GAI Y, GUO X, et al. Properties and applications of extremozymes from deep-sea extremophilic microorganisms: a mini review[J]. **Marine Drugs**, 2019, 17(12): 1-16.
- [2] ZHU D, ADEBISI W A, AHMAD F, et al. Recent development of extremophilic bacteria and their application in biorefinery[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2020, 8: 1-18.
- [3] SARMIENTO F, PERALTA R, BLAMEY J M. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends[J]. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2015, 3: 1-15.
- [4] SIDDIQUI K S. Some like it hot, some like it cold: temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes[J]. **Biotechnology Advances**, 2015, 33(8): 1912-1922.
- [5] PAN S, DING N, REN J, et al. Maltooligosaccharide-forming amylase: characteristics, preparation, and application[J]. **Biotechnology Advances**, 2017, 35(5): 619-632.
- [6] DING N, ZHAO B, BAN X, et al. Carbohydrate-binding module and linker allow cold adaptation and salt tolerance of maltopentaose-forming amylase from marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T[J]. **Frontiers in Microbiology**, 2021, 12: 1-14.
- [7] WANG Q, WANG H, YANG X, et al. A sensitive one-step method for quantitative detection of α -amylase in serum and urine using a personal glucose meter[J]. **Analyst**, 2015, 140(4): 1161-1165.
- [8] KANDRA L. α -Amylases of medical and industrial importance[J]. **Computational and Theoretical Chemistry**, 2003, 666: 487-498.
- [9] JANA M, MAITY C, SAMANTA S, et al. Salt-independent thermophilic α -amylase from *Bacillus megaterium* VUMB109: an efficacy testing for preparation of maltooligosaccharides[J]. **Industrial Crops and Products**, 2013, 41: 386-391.
- [10] HATADA Y, MASUDA N, AKITA M, et al. Oxidatively stable maltopentaose-producing α -amylase from a deep-sea *Bacillus* isolate, and mechanism of its oxidative stability validated by site-directed mutagenesis[J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2006, 39(6): 1333-1340.
- [11] MORGAN F J, PRIEST F G. Characterization of a thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* NCIB 6346[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 1992, 50(11): 107-114.
- [12] PATEL S, GOYAL A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(5): 1119-1128.
- [13] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. **Analytical Chemistry**, 1959, 31(3): 426-428.
- [14] BAEK M, DIMAIO F, ANISHCHENKO I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network[J]. **Science**, 2021, 373(6557): 871-876.
- [15] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. **Nature**, 2021, 596(7873): 1-11.
- [16] BRIAN P, TONG W, WENG Z. M-ZDock: a grid-based approach for C_n symmetric multimer docking[J]. **Bioinformatics**, 2005, 21(8): 1472-1476.
- [17] YANG J, WANG Y, ZHANG Y. ResQ: an approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction[J]. **Journal of Molecular Biology**, 2016, 428(4): 693-701.
- [18] FELLER G, LONHIENNE T, DEROANNE C, et al. Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile

- α -amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1992, 267(8): 5217-5221.
- [19] 韩煦. 直链麦芽五糖生成酶的异源表达、酶学性质及产物合成研究[D]. 无锡: 江南大学, 2021.
- [20] ZHANG Z, JIN T, XIE X, et al. Structure of maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas saccharophila* STB07 provides insights into its product specificity[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019, 154: 1303-1313.
- [21] MORISHITA Y, HASEGAWA K, MATSUURA Y, et al. Crystal structure of a maltotetraose-forming exo-amylase from *Pseudomonas stutzeri*[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1997, 267(3): 661-672.
- [22] JANECEK S, MARECEK F, MACGREGOR E A, et al. Starch-binding domains as CBM families-history, occurrence, structure, function and evolution[J]. **Biotechnology Advances**, 2019, 37(8): 1-27.
- [23] JORGENSEN A D, NOHR J, KASTRUP J S, et al. Small angle X-ray studies reveal that *Aspergillus niger* glucoamylase has a defined extended conformation and can form dimers in solution[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283(21): 14772-14780.
- [24] DAUTER Z, DAUTER M, BRZOZOWSKI A M, et al. X-ray structure of novamyl, the five-domain "maltogenic" α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*: maltose and acarbose complexes at 1.7 Å resolution[J]. **Biochemistry**, 1999, 38(26): 8385-8392.
- [25] RADIVOJAC P, OBRADOVIC Z, SMITH D K, et al. Protein flexibility and intrinsic disorder[J]. **Protein Science**, 2010, 13(1): 71-80.

科 技 信 息

研究揭示低碳背景下可持续食品冷链物流的内涵及面临挑战

近日,中国农业科学院农业资源与农业区划研究所智慧农业团队结合联合国可持续发展目标,优化了可持续冷链物流概念,并从微观-环境感知、中观-生命周期评价管理、宏观-全球影响3个维度,揭示了低碳背景下的冷链物流的发展现状及趋势。相关研究成果发表在《食品科学与食品安全综合评论 (Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety)》上。

据钱建平研究员介绍,食品冷链物流(FCCL)是一项复杂的系统工程,通过低温环境保持易腐食品的质量安全,并减少食品损失和浪费(FLW)。从制冷机制角度来看,FCCL必须在达到所需食品质量安全水平的资源成本与温室气体(GHG)排放成本之间取得平衡。在全球变暖的背景下,FLW与环境影响之间的可持续性权衡成为了高效、绿色FCCL研究的重要课题,主要体现在技术创新、管理优化、政策应对等方面。

该研究聚焦微观、中观、宏观3个层次,分析了当前研究领域现状以及FCCL在微观环境监测、生命周期评估(LCA)和全球影响方面的差距与挑战,并总结了FCCL在技术、管理、产业和可持续发展方面的未来趋势。可持续FCCL的未来趋势必将智能化、系统化和低碳化。通过新一代信息技术(如物联网、人工智能、大数据、区块链)赋能行业,促进微环境监测的多维感知、实时信息传输和可持续控制,支持LCA管理从碎片化向系统集成转型。从宏观层面来看,由于全球易腐食品损失严重,FCCL规模需求大幅增长,造成巨大的环境负担。因此,全球合作、低碳共识和适当的政策将成为推动FCCL可持续发展的基础。

[信息来源] 中国农业科学院饲料研究所. 研究揭示低碳背景下可持续食品冷链物流的内涵及面临挑战[EB/OL]. (2022-8-23). <https://www.caas.cn/xwzx/kyjz/322295.html>