

• 酶催化与生物合成机制 •

黄俊 浙江科技学院教授、博士生导师、生物与化学工程学院院长。已主持国家自然科学基金4项、浙江省重大科技专项2项、企业重大横向多项，在国际学术期刊 *Biotechnol Bioeng*、*Biochemistry* 等发表学术论文60余篇，获得国家市场监管科研成果奖一等奖1项、轻工业联合会科学技术进步奖二等奖1项。入选浙江省高校领军人才(高层次拔尖人才)、浙江省“新世纪151人才工程”第二层次培养人员，曾获2020年浙江省抗击新冠疫情先进个人、浙江省第五届师德先进个人、浙江省科技帮扶促调先进个人。



邱帅 浙江科技学院生物与化学工程学院讲师，主要研究领域为生物酶催化、蛋白质工程，在 *Chemical Engineering Science*、*Bioorganic Chemistry* 等期刊发表SCI论文共计13篇，其中第一作者5篇，申请发明专利6项，获专利授权3项，近五年主持国家自然科学基金项目1项，参与国家自然科学基金面上项目2项。



半理性设计进化土曲霉来源的 ω -转氨酶 AtTA 热稳定性

蔡婷婷¹，曹佳仁¹，邱帅^{1*}，吕常江¹，樊芳芳¹，胡升²，赵伟睿²，梅乐和^{2,3,4}，黄俊^{1*}

1 浙江科技学院生物与化学工程学院，浙江 杭州 310023

2 浙大宁波理工学院生物与化学工程学院，浙江 宁波 315100

3 浙江大学化学工程与生物工程学院，浙江 杭州 310027

4 金华高等研究院，浙江 金华 321019

蔡婷婷，曹佳仁，邱帅，吕常江，樊芳芳，胡升，赵伟睿，梅乐和，黄俊. 半理性设计进化土曲霉来源的 ω -转氨酶 AtTA 热稳定性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(6): 2126-2140.

CAI Tingting, CAO Jiaren, QIU Shuai, LYU Changjiang, FAN Fangfang, HU Sheng, ZHAO Weirui, MEI Lehe, HUANG Jun. Semi-rational evolution of ω -transaminase from *Aspergillus terreus* for enhancing the thermostability[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(6): 2126-2140.

资助项目：国家自然科学基金(32071268)；宁波市“科技创新2025”重大专项(2020Z080)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071268) and the Ningbo “Scientific and Technological Innovation 2025” Key Project (2020Z080).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Jun, huangjun@zust.edu.cn; QIU Shuai, qiushuai@zust.edu.cn

Received: 2022-11-18; Accepted: 2023-01-26; Published online: 2023-01-31

摘要: ω -转氨酶(ω -transaminase, ω -TA)作为一种天然的生物催化剂, 在手性胺类化合物的合成中具有较好的应用前景。但 ω -TA 在催化非天然底物的反应过程中存在稳定性差、活性低的缺陷, 大大限制了 ω -TA 的应用。为改善此缺陷, 针对来源于土曲霉(*Aspergillus terreus*)的(*R*)- ω -TA (*AtTA*), 采用基于分子动力学模拟的计算机辅助设计与随机突变、组合突变相结合的策略进行酶的热稳定性改造, 获得了热稳定性与活性同步提高的最佳突变酶 *AtTA*-E104D/A246V/R266Q (M3)。与 *AtTA* 野生酶(wild-type, WT)相比, M3 的半衰期 $t_{1/2}$ (35 °C)由 17.8 min 提升至 102.7 min, 提升了 4.8 倍, 半失活温度 T_{50}^{10} 比 WT (38.1 °C)提高 2.2 °C。最佳突变酶 M3 对丙酮酸和 1-(*R*)-苯乙胺的催化效率分别是野生酶的 1.59 倍和 1.56 倍。分子动力学模拟与分子对接结果表明, 分子内氢键与疏水相互作用的增加所导致 α -螺旋的加固稳定是酶热稳定性提升的主要原因; 底物分子与结合口袋氨基酸之间氢键相互作用的增加以及底物结合口袋体积的增大是导致 M3 催化效率提升的主要原因。底物谱测定结果表明, 相较于 WT, M3 对 11 种芳香酮类化合物的催化性能均有所提升, 进一步说明 M3 对手性胺的合成具有更高的应用价值。

关键词: 手性胺; ω -转氨酶; 热稳定性; 半理性设计; 分子动力学模拟; α -螺旋

Semi-rational evolution of ω -transaminase from *Aspergillus terreus* for enhancing the thermostability

CAI Tingting¹, CAO Jiaren¹, QIU Shuai^{1*}, LYU Changjiang¹, FAN Fangfang¹, HU Sheng², ZHAO Weirui², MEI Lehe^{2,3,4}, HUANG Jun^{1*}

1 School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

2 School of Biological and Chemical Engineering, Ningbo Tech University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

3 College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China

4 Jinhua Advanced Research Institute, Jinhua 321019, Zhejiang, China

Abstract: ω -transaminase (ω -TA) is a natural biocatalyst that has good application potential in the synthesis of chiral amines. However, the poor stability and low activity of ω -TA in the process of catalyzing unnatural substrates greatly hampers its application. To overcome these shortcomings, the thermostability of (*R*)- ω -TA (*AtTA*) from *Aspergillus terreus* was engineered by combining molecular dynamics simulation assisted computer-aided design with random and combinatorial mutation. An optimal mutant *AtTA*-E104D/A246V/R266Q (M3) with synchronously enhanced thermostability and activity was obtained. Compared with the wild-type (WT) enzyme, the half-life $t_{1/2}$ (35 °C) of M3 was prolonged by 4.8-time (from 17.8 min to 102.7 min), and the half deactivation temperature (T_{50}^{10}) was increased from 38.1 °C to 40.3 °C. The catalytic efficiencies toward pyruvate and 1-(*R*)-phenylethylamine of M3 were 1.59- and 1.56-fold that of WT. Molecular dynamics simulation and molecular docking showed that the reinforced stability of α -helix caused by the increase of hydrogen bond and hydrophobic interaction in molecules was the main reason for the improvement of enzyme thermostability.

The enhanced hydrogen bond of substrate with surrounding amino acid residues and the enlarged substrate binding pocket contributed to the increased catalytic efficiency of M3. Substrate spectrum analysis revealed that the catalytic performance of M3 on 11 aromatic ketones were higher than that of WT, which further showed the application potential of M3 in the synthesis of chiral amines.

Keywords: chiral amines; ω -transaminases; thermostability; semi-rational design; molecular dynamic simulation; α -helix

手性胺是手性中心含有氨基的一类小分子化合物,它是多种药物活性分子的重要结构单元^[1-3]。据统计,在最常用的200种小分子处方药中,超过1/3含有手性胺结构^[4-5],如用于治疗阿尔兹海默病的卡巴拉汀^[6]、抗糖尿病药物的主要成分西他列汀^[7]、拟钙剂盐酸西那卡塞^[8]等。酶促不对称合成是制备手性胺的重要方法,常用的酶有单加氧酶、亚胺还原酶、氨基酸脱氢酶、转氨酶等^[9-13]。其中 ω -转氨酶因底物谱相对广泛、辅酶相对廉价、产物纯度高等优点,受到研究人员广泛青睐^[14-15]。

ω -转氨酶(ω -transaminase, ω -TA)是一种5'-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5'-phosphate, PLP)依赖性酶^[16-17],以酮类化合物为原料,将供体分子中的氨基立体选择性地转移到前手性酮分子上,高效制备手性胺^[5,18],反应过程如图1所示。目前,已在多种微生物中发现了 ω -转氨酶,包括河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)、节杆菌(*Arthrobacter*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和土曲霉(*Aspergillus terreus*)等^[19-22]。虽然 ω -转氨酶在合成手性胺方面有较好的应用前景,但目前发现

的野生酶存在稳定性差、催化效率低等诸多不足,不利于应用到工业生产中^[23]。此外,在酶催化过程中,提高反应温度可以提高疏水性底物的溶解度^[24]、防止微生物的生长^[25]、增加反应速率^[26]等,然而大多数酶喜室温或低温条件^[27],难以抵抗高温反应条件,因此,对酶的热稳定性进行改造具有重要的应用价值。蛋白质工程作为强有力的工具在酶分子改造中愈发重要,通过蛋白质工程改善酶的热稳定性具有重要的科学意义^[28-29]。

在酶的热稳定性改造的过程中,普遍存在稳定性与活性之间相互权衡的 trade-off 效应^[30-33],建立一种高效提升热稳定性而不降低酶活性的方法仍然是一重要挑战。Cao 等^[34]采用随机-半理性相结合的突变策略对节杆菌属来源的 ω -转氨酶进行改造,最终获取了稳定性与活性同步提升的突变体;Jia 等^[35]对毛霉属来源的转氨酶进行口袋改造,最终获得同步进化的鲁棒性酶。

本研究通过对来自土曲霉属的 ω -转氨酶(*AtTA*)进行不同温度下的分子动力学模拟锚定

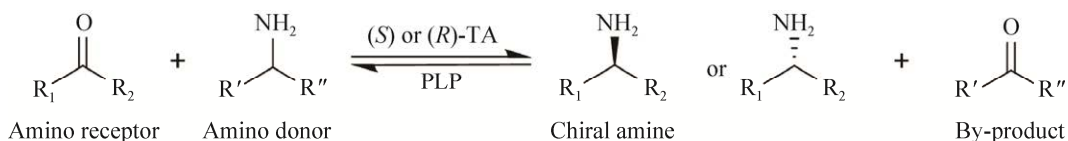


图1 转氨酶的转氨反应通式

Figure 1 The general reaction formula of transamination reaction via TA.

影响酶热稳定性的关键氨基酸区域, 采用随机突变与组合突变相结合的策略, 获得热稳定性和活性同时提高的突变酶, 进而从分子机制解释酶稳定性与活性同步提升的原因。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

菌株与质粒: 表达宿主大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司、重组质粒 pET-28a(+)-AtTA 由安徽通用生物公司构建并合成。

Luria-Bertani (LB)培养基: 称取 10.0 g 蛋白胨、10.0 g 氯化钠、5.0 g 酵母粉溶于去离子水中并定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min。

酶、试剂、引物和脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 序列测定: 限制性核酸内切酶和胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物合成和 DNA 测序由有康生物科技有限公司完成。

1.2 易错 PCR 构建随机突变文库

以 pET-28a(+)-AtTA 为模板, 使用引物 P1、P2、P3 和 P4 (表 1) 进行目的片段扩增。在 PCR 反应混合体系中加入 100 $\mu\text{mol/L}$ MnCl_2 水溶液用于控制突变概率, 使得每个基因有 1-3 个突变位点。以扩增后的目的片段为引物, 以 pET-28a(+)-AtTA 为模板进行全质粒 PCR。将 PCR 产物回收纯化并使用 *Dpn* I 处理以切除模板 DNA, 然后加入到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞中, 混合冰浴 30 min, 42 °C 水浴热击 90 s, 置于冰上冷却 5 min, 再向 eppendorf 管中加入 650 μL LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养 2 h。取 100 μL 菌液均匀涂布于含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 的硫酸卡那霉素的 LB 平板上, 37 °C 培养 24 h。

表 1 易错 PCR 和定点突变所使用的引物列表

Table 1 Primers for error-prone PCR and site-directed mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5'→3')
P1-F	CTGGAAAGCACCGAAACCACCAACCCGTTT
P1-R	CCGAGCGTGTGGGATGGCCGCTTTTTTCGC
P2-F	CATATTACCCGCCTGGAAGCGAGCTGCACC
P2-R	GGCGTGCGCGGCACCCGCCGGAAGATATT
P3-F	AGCGGCTTTAACATTGTGCTGGTGAAAGAT
P3-R	GAAATTTTTATGTGCACCACCGCGGGCGGC
P4-F	GGCGTGACCCGCAAAGCGTGATTAACGCG
P4-R	GGCATGCCGGTGAACGGCGGCCAGATTGGC
A42H-F	GTTCTTTA <u>CAT</u> GAAAGCACGC
A42H-R	GCGTGCTT <u>CAT</u> GTAAGGAAC
E104D-F	ATCCTGGTGGATATGGTTCGCA
E104D-R	TGCGACCATAT <u>TCC</u> ACCAGGAT
A246V-F	GTTATCAAC <u>GTT</u> GCTGAAGCC
A246V-R	GGCTTCAGCA <u>AAC</u> GTTGATAAC
R266Q-F	GGCCTACCAGTGTGACGAGATT
R266Q-R	AATCTCGTCACACT <u>GTT</u> AGGCC

The underlined codons are amino acid codons after the mutation.

1.3 高通量筛选方法

使用无菌牙签挑取平板上的单菌落接种至含 1 mL LB 培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 硫酸卡那霉素)的 96 深孔板中, 于 37 °C、180 r/min 培养 8 h 后加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG), 在 25 °C、150 r/min 培养 18 h 诱导目的蛋白表达。诱导结束后, 在 4 500 r/min 离心 15 min 收集菌体, 将菌体用磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0) 重悬离心洗涤 2 次后置于 -80 °C 冷冻 20 h, 反复冻融 3 次后向每孔中加入 250 μL 细胞裂解液 (5 mg/mL 溶菌酶), 重悬菌体后于 37 °C、400 r/min 孵育 1 h, 4 °C、4 500 r/min 离心 15 min 收集上清。转移各孔 100 μL 上清至 96 微孔板的相应位置, 将 96 微孔板置于 35 °C 恒温仪中孵育 30 min, 随后将

96 微孔板冰浴 10 min。吸取 20 μ L 冰浴处理后的酶溶液置于石英 96 孔板中, 加入 180 μ L 反应溶液[50 mmol/L pH 8.0 的磷酸盐缓冲液, 含 0.25% (体积分数)二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、2.5 mmol/L 丙酮酸、2.5 mmol/L (R)-(+)-苯乙胺、0.1 mmol/L PLP], 在 30 $^{\circ}$ C、pH 8.0 条件下反应 3 min 后, 用酶标仪检测波长在 245 nm 处相应的酶活^[36]来初筛正突变子。

1.4 组合突变体的构建及筛选

将通过易错 PCR 和高通量筛选获得的突变体进行组合, 构建多位点突变体。以重组质粒 pET-28a(+)-AtTA 为模板, 采用全质粒 PCR 方法进行定点突变, 经 *Dpn* I 消化 PCR 模板后, 将构建的质粒转化至大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3), 挑选有益突变体用于表达纯化并进行酶的活性测定。通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定生成的目的手性胺产物丙氨酸的生成量, 进而计算酶的活性。一个酶活单位 U 定义为: 在 30 $^{\circ}$ C、pH 8.0 条件下每分钟每生成 1 μ mol 的丙氨酸所需要的酶量。比酶活定义为每毫克蛋白所具有的酶活性单位数, 记为 U/mg。

丙氨酸 HPLC 检测方法: 向 0.2 mL 反应后的溶液中加入 0.3 mL 200 mmol/L NaHCO_3 (pH 9.8)终止反应, 然后向其中加入 0.5 mL 丹磺酰氯溶液(4 mg/mL), 在 40 $^{\circ}$ C 条件下进行衍生化 1 h, 用 0.22 μ m 滤膜将反应液过滤后进行 HPLC 检测, 色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 column (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m)。使用由溶液 A (水:甲酸=99.9:0.1, 体积比)和溶液 B (乙腈:甲酸=99.9:0.1, 体积比)组成的流动相进行梯度洗脱。洗脱梯度: 溶液 B 在 15 min 内从 20%逐渐增加到 100%, 然后在 5 min 后降至 20%, 流速为 1.0 mL/min, UV (ultraviolet) 检测波长为 254 nm。

1.5 酶的表达与纯化

挑取野生型及突变体单菌落接种至 5 mL 含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 8 h 后, 将菌液转接至 200 mL 的 LB 培养基中(含 50 μ g/mL 硫酸卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 条件下继续培养 18 h, 于 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心收集菌体。

将收集的菌体经磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0)离心洗涤 2 次后重悬于 50 mL 细胞破碎缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑溶液, pH 8.0)中, 在 75 MPa 下高压均质 2 min, 直至溶液澄清后, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 50 min, 收集上清液。将上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤后由 Ni-NTA 亲和层析获取目标蛋白, 依次加入 3 倍柱体积的细胞破碎缓冲液和清洗缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 50 mmol/L 咪唑溶液, pH 8.0)除去杂蛋白, 随后用 1 倍柱体积的洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)收集目的蛋白, 并分别采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳和改良型 Bradford 法测定纯化后的蛋白纯度及浓度。

1.6 酶学性质的测定

1.6.1 热稳定性测定

酶的热力学参数表征主要包括半衰期($t_{1/2}$)、半失活温度(T_{50}^{10})和热解折叠温度(T_m)。 $t_{1/2}$ 是指在特定温度下, 酶的活力下降至 50%所需的时间。 T_{50}^{10} 是指在不同温度孵育 10 min 后, 酶的活力降至 50%的温度。 T_m 是指蛋白质在温度上升的过程中, 50%蛋白质去折叠时的温度。

$t_{1/2}$ 测定: 将野生酶和突变酶分别在 35 $^{\circ}$ C

孵育 0–180 min 或 40 °C 孵育 0–30 min 后立即在冰上冷却 10 min, 然后取 20 μ L 纯酶稀释液和 180 μ L 的底物溶液在 30 °C、pH 8.0 条件混合反应 3 min 后, 通过 HPLC 检测产物丙氨酸的生成量, 并计算相应的酶活力。利用一级失活方程计算半衰期。热失活方程为:

$$A_t = A_0 \exp(-k_d t)$$

其中 k_d 为酶失活动力学常数, A_t 是不同时间下的酶活, A_0 为初始酶活, 当 A_t 为 A_0 的一半时, 对应的时间 t 即为酶的半衰期 $t_{1/2}$ 。

T_{50}^{10} 测定: 纯化的酶溶液分别于 4、30、35、37、40、42、45、47、50、55 °C 下孵育 10 min, 然后在冰上冷却 10 min, 采用上述方法测定酶活力。

T_m 测定: 示差扫描荧光法 (differential scanning fluorimetry, DSF) 是一种鉴定蛋白热稳定性的快速高效的方法^[37]。荧光染料分子对于蛋白质表面的疏水部分有亲和力, 能够在蛋白质解开三级结构时发出荧光信号, 从而通过监控荧光染料分子的荧光值随时间逐渐增强来计算蛋白质的热解折叠温度。取 49 μ L 0.1 mg/mL 纯酶稀释液、1 μ L 50 \times SYPRO Orange 染料混合后利用荧光定量 PCR 仪进行测量。扫描温度为 25–70 °C, 每次升温 0.7 °C 并在该温度保持 30 s, 激发波长和发射波长分别为 490 nm 和 605 nm。 T_m 计算公式如下所示:

$$y = UF + \frac{NF - UF}{1 + e^{-\frac{T_0 - x}{\alpha}}}$$

其中 UF 和 NF 分别为最小和最大的荧光发射强度, α 是 T_0 内曲线的斜率。

1.6.2 动力学参数的测定

分别设定丙酮酸和 1-(*R*)-苯乙胺的浓度梯度为 0–5 mmol/L 和 0–3 mmol/L, 同时固定另一种底物的浓度为 2.5 mmol/L, 测量不同底物浓度下的反应速率, 计算 AtTA 及其突变体分别

对 1-(*R*)-苯乙胺和丙酮酸的动力学参数。动力学结果使用 Origin 8.0 中的 Michaelis-Menten 方程进行拟合计算。

1.7 底物谱测定

以 1-(*R*)-苯乙胺为胺基供体, 选定苯甲醛、苯乙酮、4-氟苯乙酮、4-氯苯乙酮、4-溴苯乙酮、4-甲氧基苯乙酮、4-甲基苯乙酮、4-三氟甲基苯乙酮、4-硝基苯乙酮、1-乙酰基萘、2-乙酰基萘、 α -四氢萘酮为氨基受体, 进行催化反应。2 mL 反应体系分别包括 10 mmol/L 1-(*R*)-苯乙胺、10 mmol/L 各酮类底物、0.1 mmol/L PLP、50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0)、0.15 mg/mL 纯酶液。30 °C、180 r/min 反应 24 h 后通过 HPLC 测定各产物生成量并计算产率与产物的对映体过量值 (enantiomeric excesses, *e.e.*)。

HPLC 检测方法: 用 0.22 μ m 滤膜将反应液过滤后进行 HPLC 检测, 色谱柱为 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 mm \times 150 mm, 4.0 μ m), 流动相为乙腈:水 = 40:60 (体积比), 流速为 1.0 mL/min, UV 检测波长为 210 nm。

1.8 分子动力学模拟

从 PDB (protein data bank) 数据库中搜索得到来源于土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的 (*R*)- ω -转氨酶晶体结构 (PDB ID: 4CE5) 作为模板, 采用 FoldX 建模方法构建突变体的三维结构, 并使用 YASARA 16.4.6 软件 (<http://www.yasara.org>) 中的 Amber14 力场, 在 303 K 和 313 K 温度下对野生酶和突变酶进行时长为 20 ns 的动力学模拟^[38]。蛋白质的空间环境是充满密度为 0.998 g/mL 的水的 10 \AA \times 10 \AA \times 10 \AA 立方体, 介质中加入 Na^+ 和 Cl^- (0.9%) 作为对抗离子形成电中性体系, 可电离基团在 pH 8.0 时根据 pKa 值质子化。在分子力学水平上, 将范德华作用力和静电相互作用的短程截断距离设置为 8.0 \AA ,

采用 Particle Mesh Ewald 方法计算长程静电相互作用。

2 结果与分析

2.1 有义突变区域的鉴定

分子动力学(molecular dynamics, MD)模拟中的均方根波动(root mean square fluctuation, RMSF)值通常反映单个氨基酸残基的波动,对 RMSF 数值高的氨基酸残基进行突变是常见的提高酶热稳定性的方法。RMSF 值与所对应的氨

基酸及其区域的柔性呈正相关^[39]。对 *AtTA* 野生酶分别在 35 °C 和 45 °C 下进行 20 ns 的分子动力学模拟,并分析每个氨基酸位点的 RMSF 偏移值,对 35 °C 和 45 °C 下氨基酸位点的 RMSF 值取差值($\Delta\text{RMSF}=\text{RMSF}_{45\text{ °C}}-\text{RMSF}_{35\text{ °C}}$)得到氨基酸残基随着温度的升高, RMSF 变化较大的位点及所在区域。如图 2A、2B 所示,氨基酸位点 RMSF 值变化较大的区域主要集中于 4 个区域(图中所示 Hotspot region 1, Hotspot region 2, Hotspot region 3, Hotspot region 4),通过分析

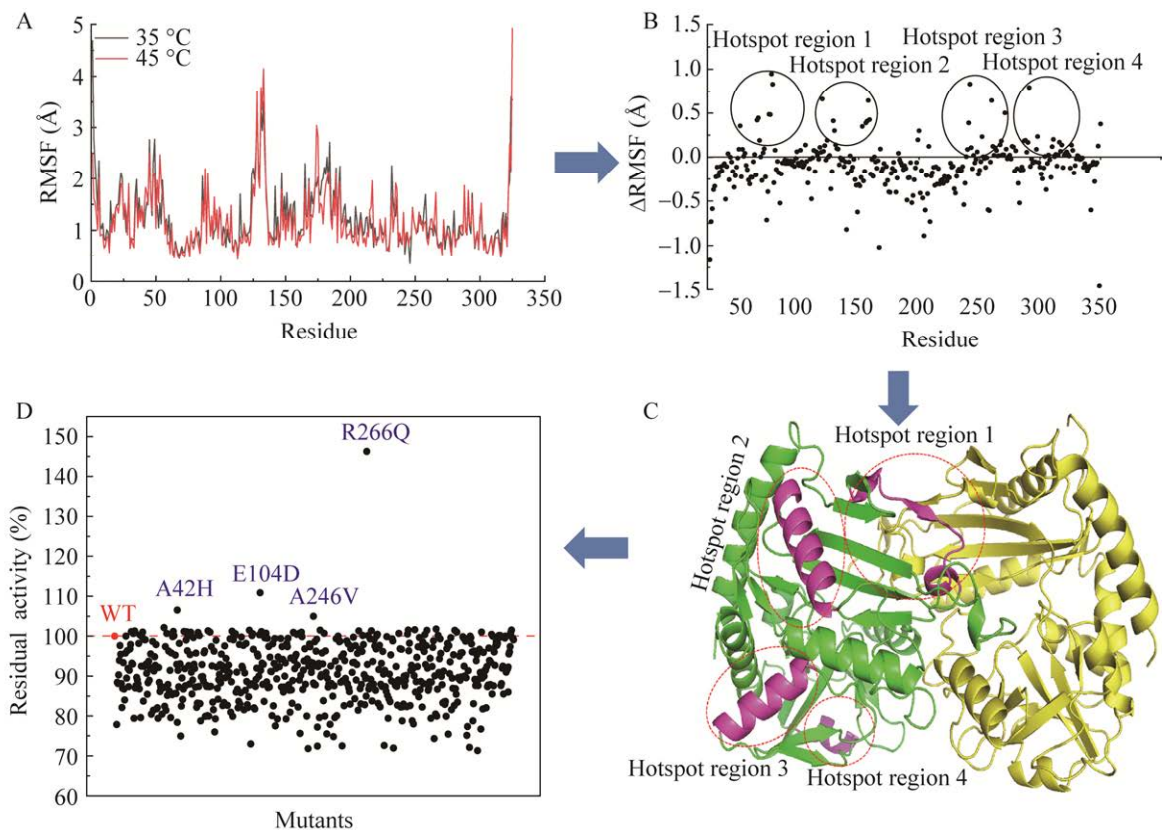


图 2 MD 模拟鉴定突变热点区域与突变筛选验证 A: *AtTA*-WT 在 35 °C 和 45 °C 下的 RMSF 对比图。B: *AtTA*-WT 在 35 °C 和 45 °C 下的 RMSF 差值图($\Delta\text{RMSF}=\text{RMSF}_{45\text{ °C}}-\text{RMSF}_{35\text{ °C}}$)。C: 4 个随机突变区域位置图。D: *AtTA* 区域随机突变筛选全景图

Figure 2 The identification of hotspots *via* MD simulation and mutation screening verification. A: RMSF comparison of *AtTA*-WT at 35 °C and 45 °C. B: RMSF difference of *AtTA*-WT at 35 °C and 45 °C ($\Delta\text{RMSF}=\text{RMSF}_{45\text{ °C}}-\text{RMSF}_{35\text{ °C}}$). C: Distribution map of 4 random mutation regions. D: The screening landscape of region random mutation.

4 个热点区所在的蛋白结构位置,我们发现, Hotspot region 2, 3, 4 位于 α -螺旋区域处, Hotspot region 1 则位于 α -螺旋、 β -折叠、loop 区域的交界处(图 2C)。选取这 4 个潜在的突变热点区域进行 AtTA 的热稳定性改造,以期获得影响酶热稳定性的关键氨基酸位点。

2.2 随机突变与组合突变构建突变体

采用易错 PCR 方法对 WT 的 4 个突变热点区域进行随机突变,以丙酮酸和 1-(R)-苯乙胺作为底物进行高通量筛选,最终筛选出 4 个热稳定性提升的单突变体:A42H、E104D、A246V、R266Q,其残余活性较 WT 分别提升了 6.5%、10.9%、5.0%、46.3%(图 2D)。将这 4 个单突变体进行组合,构建了以下 8 个组合突变体:A42H/E104D、A42H/A246V、A42H/R266Q、E104D/A246V、E104D/R266Q、A42H/E104D/A246V、E104D/A246V/R266Q、A42H/E104D/

A246V/R266Q,并对 8 个组合突变体的热力学、动力学参数等酶学性质进行测定。

2.3 野生酶和突变酶的热稳定性测定

按照 1.6.1 所述方法测定了野生酶与突变酶的半衰期($t_{1/2}$)、半失活温度(T_{50}^{10})和热解折叠温度(T_m),结果如表 2 所示。相比于野生酶,4 个单突变体的热稳定性均有不同程度的提高,其中 R266Q 的热稳定性提升最明显,其在 35 °C 下的半衰期由 17.8 min 提升至 83.0 min,是野生酶的 4.7 倍,半失活温度提升至 40.3 °C,较野生酶(38.1 °C)提高 2.2 °C。组合突变体中,与 R266Q 相组合的突变体较野生酶的 $t_{1/2}$ (35 °C)至少提升 2.6 倍,这说明 266 位点是提升该酶热稳定性的一个关键位点。最佳突变体 E104D/A246V/R266Q (M3)在 35 °C 下的半衰期达到 102.7 min,较野生酶 WT 提高了 4.8 倍,其 T_{50}^{10} 和 T_m 值分别比 WT 提高 4.3 °C 和 2.4 °C。

表 2 野生酶和突变酶的热力学参数

Table 2 Stability of WT and mutants

Enzyme	35 °C $t_{1/2}$ (min)	35 °C $\Delta t_{1/2}$ (min) ^a	40 °C $t_{1/2}$ (min)	40 °C $\Delta t_{1/2}$ (min) ^b	T_{50}^{10} (°C)	ΔT_{50}^{10} (°C) ^c	T_m (°C)	ΔT_m (°C) ^d
WT	17.8±1.1	0.0	6.9±0.6	0.0	38.1±0.2	0.0	41.4±0.2	0.0
A42H	20.0±0.7	2.2	7.6±0.3	0.7	38.4±0.3	0.3	42.0±0.4	0.6
E104D	19.6±0.8	1.8	7.4±0.7	0.5	38.4±0.7	0.3	41.5±0.1	0.1
A246V	19.9±0.9	2.1	7.4±0.2	0.5	38.2±0.2	0.1	41.8±0.3	0.4
R266Q	83.0±2.9	65.2	13.5±0.4	6.6	40.3±0.7	2.2	42.6±0.2	1.2
A42H/E104D	18.0±0.9	0.2	7.1±0.3	0.2	39.0±0.2	0.9	42.3±0.5	0.9
A42H/A246V	20.0±1.3	2.2	7.5±0.6	0.6	39.3±0.3	1.2	42.4±0.4	1.0
A42H/R266Q	96.8±2.7	79.0	21.7±0.5	14.8	41.9±0.1	3.8	43.3±0.2	1.9
E104D/A246V	26.9±1.1	9.1	8.9±0.8	2.0	38.4±0.2	0.3	42.5±0.5	1.1
E104D/R266Q	46.5±1.8	28.7	11.4±0.9	4.5	40.1±0.3	2.0	43.3±0.2	2.9
A42H/E104D/A246V	28.5±1.5	10.7	9.4±0.4	2.5	38.8±0.8	0.7	41.7±0.4	0.3
E104D/A246V/R266Q (M3)	102.7±2.6	84.9	22.7±0.6	15.8	42.4±0.4	4.3	43.8±0.2	2.4
A42H/E104D/A246V/R266Q	86.8±2.8	69.0	17.1±0.7	10.2	40.9±0.1	2.8	43.5±0.3	2.1

^a: The $t_{1/2}$ values of mutants compared to WT at 35 °C; ^b: The $t_{1/2}$ values of mutants compared to WT at 40 °C; ^c: The T_{50}^{10} values of mutants compared to WT; ^d: The T_m values of mutants compared to WT.

2.4 野生酶和突变酶的动力学参数表征

按照 1.6.2 所述的方法, 分别以丙酮酸和 1-(R)-苯乙胺为底物测定野生酶和各突变酶的米氏动力学常数, 由表 3 可知, 野生酶对丙酮酸的催化效率($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{pyruvate}}$)为 2.17 L/(mmol·s), 相较于野生酶, 所得到的大部分突变体对丙酮酸的催化效率出现了降低的现象, 这说明在热稳定性的改造过程中存在活性-稳定性此消彼长的 trade-off 效应, 而最佳突变体 E104D/A246V/R266Q 的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{pyruvate}}$ 是野生酶的 1.59 倍, 并未出现活性降低的现象。野生酶对 1-(R)-苯乙胺的催化效率($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{1-(R)\text{-PEA}}$)为 2.78 L/(mmol·s), 最佳突变体 E104D/A246V/R266Q 的 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{1-(R)\text{-PEA}}$ 为 4.33 L/(mmol·s), 是野生酶的 1.56 倍, 由此表明, 突变酶 E104D-A246V-R266Q 实现了活性-稳定性的同步提升。

2.5 热稳定性-活性提升的分子机制解析

为阐明突变体 M3 稳定性与催化效率同步

提高的分子机制, 通过 YASARA 进行了分子对接和分子动力学模拟。首先利用 FoldX 软件以 WT 晶体结构(PDB: 4CE5)为模板, 对 M3 进行 3D 结构的重建, 并分别对 WT 和 M3 进行 20 ns 的分子动力学模拟, 如图 3A 所示, M3 在 5 ns 处的结构动态趋于平稳, 而 WT 在 7.5 ns 时结构趋于平稳, 且 M3 整体的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值要低于 WT, 此结果表明 M3 较 WT 的蛋白结构更加稳定。进一步分析 WT 与 M3 的 RMSF 值, 如图 3B 所示, *AtTA*-M3 所编码的 325 个氨基酸的平均 RMSF 值(1.154 Å)低于 *AtTA*-WT 所编码的 RMSF 值(1.232 Å)。通过分析 3 个突变位点 104、246、266 及其所在的二级结构区域 RMSF 值, 可以看出, 突变体 M3 中的突变位点及其所在区域 RMSF 值均低于 WT 中位点及所在区域 RMSF 值, 这一结果表明 M3 的整体及突变区域的刚性增强, 加固了突变酶的热稳定性。

表 3 野生酶和突变酶的动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of WT and mutants

Enzyme	$k_{\text{cat}}^{\text{pyruvate}}$ (s^{-1})	$K_{\text{m}}^{\text{pyruvate}}$ (mmol/L)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{pyruvate}}$ (L/(mmol·s))	$k_{\text{cat}}^{1-(R)\text{-PEA}}$ (s^{-1})	$K_{\text{m}}^{1-(R)\text{-PEA}}$ (mmol/L)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{1-(R)\text{-PEA}}$ (L/(mmol·s))
WT	0.50±0.01	0.23±0.02	2.17	0.64±0.01	0.23±0.03	2.78
A42H	1.45±0.04	0.71±0.05	2.02	0.78±0.08	0.23±0.02	3.39
E104D	1.55±0.04	0.82±0.07	1.88	0.72±0.06	0.24±0.01	2.95
A246V	0.94±0.07	0.54±0.06	1.74	0.76±0.02	0.21±0.01	3.66
R266Q	1.77±0.01	0.68±0.05	2.60	0.78±0.04	0.26±0.01	3.00
A42H/E104D	1.50±0.08	0.69±0.05	2.15	0.61±0.05	0.20±0.01	3.00
A42H/A246V	1.00±0.01	0.46±0.02	2.17	0.61±0.07	0.20±0.01	3.01
A42H/R266Q	1.93±0.05	0.65±0.01	2.97	0.74±0.08	0.23±0.02	3.22
E104D/A246V	1.05±0.04	0.46±0.03	2.28	0.74±0.05	0.20±0.03	3.69
E104D/R266Q	1.03±0.04	0.57±0.05	1.81	0.79±0.05	0.25±0.03	3.07
A42H/E104D/A246V	1.00±0.02	0.72±0.03	1.39	0.85±0.02	0.33±0.01	2.55
E104D/A246V/R266Q (M3)	1.56±0.03	0.45±0.01	3.47	1.04±0.08	0.24±0.01	4.33
A42H/E104D/A246V/R266Q	1.38±0.02	0.55±0.01	2.51	0.76±0.05	0.25±0.02	2.94

为了更加深入地解释突变位点刚性增强的原因,对突变体 M3 的突变位点与其周围的氨基酸残基进行了相互作用力的分析,如图 4 所示,当 104 号位点由谷氨酸突变为天冬氨酸时, M3 中增加了 Asp104 与 Arg324 之间的氢键(图 4A、4D);当 246 位点的丙氨酸突变为缬氨酸

时, Val246 与 Phe250 之间形成 1 个 Pi-烷基作用力(图 4B、4E);当 266 位点的精氨酸突变为谷氨酰胺时,除了 Gln266 与 Leu263 之间存在氢键外,额外增加了 Gln266 与 Glu262 之间的氢键(图 4C、4F)。所增加的分子内的相互作用力对突变体 M3 稳定性的提升具有重要作用。

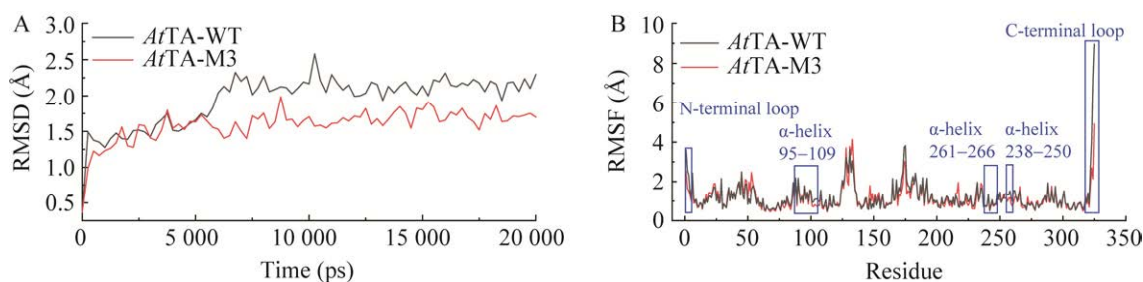


图 3 WT 与 M3 的分子动力学模拟结果 A: WT 与 M3 在 35 °C 下的 RMSD 分析. B: WT 与 M3 在 35 °C 下每个残基的 RMSF 分析

Figure 3 The MD results of WT and M3. A: The RMSD of WT and M3 at 35 °C. B: The RMSF value of each residue in WT and M3 at 35 °C.

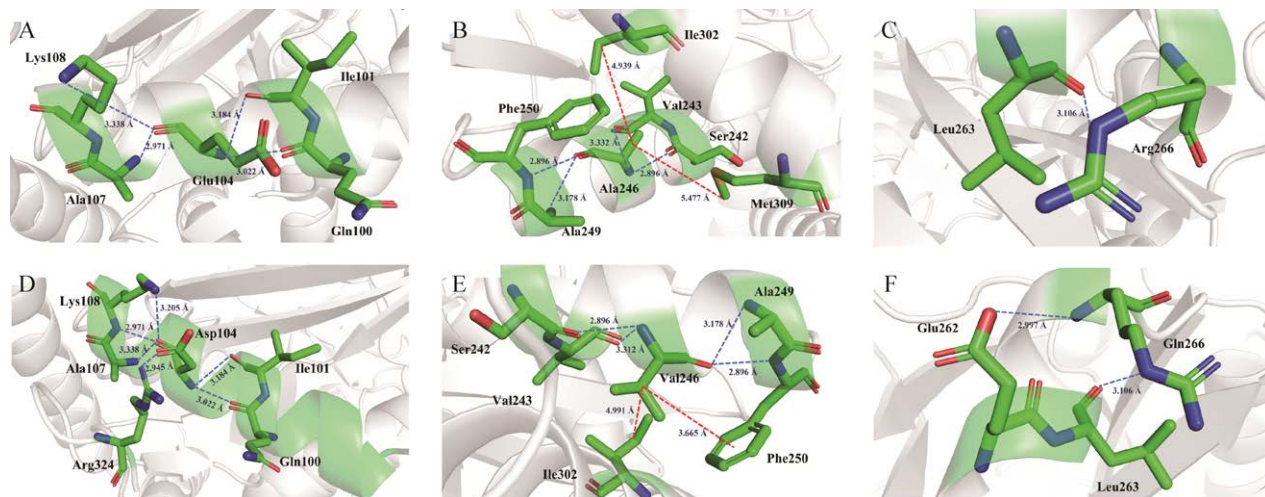


图 4 M3 中突变位点与周围氨基酸的相互作用分析 A、B、C 为 WT 中 3 个原始突变位点与周围氨基酸的受力分析; D、E、F 为 M3 中突变位点与周围氨基酸的相互作用. 蓝色虚线代表氢键; 红色虚线代表疏水相互作用

Figure 4 Analysis of the interaction analysis between the mutation site and surrounding amino acids in M3. A, B, and C are the interactions between the three original mutation sites and surrounding amino acids in WT; D, E, and F are the interactions between the mutation sites and surrounding amino acids in M3. Blue dotted line represents hydrogen bond; Red dotted line represents hydrophobic interaction.

通过对 *AtTA* 的三维结构进行分析, 我们发现最佳突变体 M3 的 3 个突变位点均位于 α -螺旋, 利用圆二色光谱仪(circular dichroism spectrometer, CD)在 190–260 nm 波长下的紫外吸收光值对 WT 及 M3 的二级结构各元素进行分析, 如图 5 所示, 当温度从 30 °C 增加到 55 °C 时, WT 和 M3 所保留的二级结构明显减少。在 30 °C 和 55 °C 下, WT 和 M3 的二级结构表现出差别。随着温度的升高至 55 °C 时, WT 在平面偏振波长 222、208、192 nm 下所对应的摩尔椭圆率 $[\theta]$ 分别是 -8.45、-2.18、9.41 deg cm²/dmol, M3 在 3 处平面偏振波长下所对应的摩尔椭圆率分别为 -9.04、-3.39、11.45 deg cm²/dmol, M3 较 WT 保留下了更多的 α -螺旋结构。这表明 M3 中的 α -螺旋更加稳定, 这与 M3 热稳定性的提升也是相对应的。

为了阐明突变体 M3 活性提升的原因, 对 WT 与 M3 分别进行与底物丙酮酸的分子对接, 作用力模拟分析表明(图 6A), WT 与丙酮酸的对接结果显示, 丙酮酸与 WT 的 5 个氨基酸及 PLP 之间分别存在 2 组氢键与 4 组疏水相互作用力; 而突变体 M3 与丙酮酸之间的相互作用

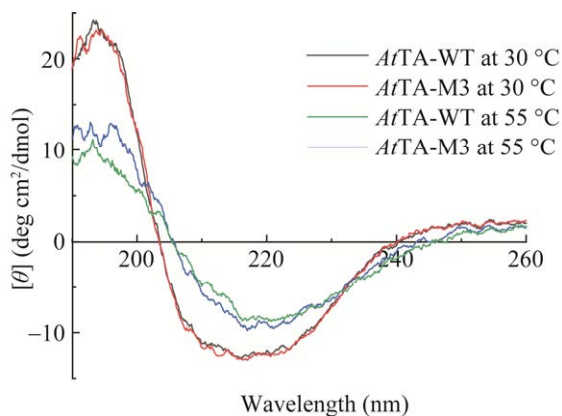


图 5 WT 与 M3 在 30 °C 和 55 °C 下的圆二色光谱分析

Figure 5 CD spectra of WT and M3 at 30 °C and 55 °C.

力显示, 丙酮酸与 M3 中 6 个氨基酸及 PLP 之间存在 4 组氢键及 4 组疏水相互作用力。通过对 WT 与 M3 进行底物结合口袋体积计算发现(图 6B), 突变体 M3 较 WT 的底物结合口袋体积增大, 由 796.6 Å³ (WT) 增加至 939.1 Å³ (M3), 这一结果表明酶底物结合口袋的扩大, 增加了其与底物间碰撞频率, 进一步解释了突变酶活力提升的原因。

2.6 野生酶与突变体 M3 的底物特异性分析

为了验证突变酶 M3 对不同底物的催化性能, 在 10 mmol/L 各底物浓度下, 进行 WT 和 M3 的酶催化反应, 结果如表 4 所示。无论在 30 °C 还是 40 °C 条件下, 反应 24 h 后, M3 对所催化的 11 种底物的产率较 WT 均表现出提升的趋势, 除 S1 生成相应的无手性产物外, 其他所生成的产物均为严格的 *R*-构型(*e.e.*>99.5%)。在 30 °C 反应条件下, M3 催化 11 种底物生成相应产物的产率较 WT 约提升 11.1%–229.2%, 在 40 °C 反应条件下, M3 催化 11 种底物的产率较 WT 约提升 3.7%–125.8%。M3 稳定性的提升对于催化酮类底物生成胺产物也表现出明显的优势。总体来说 M3 对多种芳香酮类底物较 WT 表现出较好的催化活性。

3 结论

本研究采用随机突变和半理性设计相结合的策略, 对来源于 *Aspergillus terreus* 的 ω -转氨酶 *AtTA* 进行蛋白质工程改造, 筛选得到热稳定性提升的突变酶 R266Q、A42H/R266Q、E104D/A246V/R266Q、A42H/E104D/A246V/R266Q, 其中 E104D/A246V/R266Q (M3) 提升最明显, 与 WT 相比, 其 $t_{1/2}$ (35 °C) 由 17.8 min 提升至 102.7 min, 提升了 4.8 倍, 且最佳突变体的催化效率略有提升, 其 $k_{cat}/K_m^{pyruvate}$ 、 $k_{cat}/K_m^{1-(R)-PEA}$ 分别是 WT 的 1.59 倍、1.56 倍, 实现了稳定性

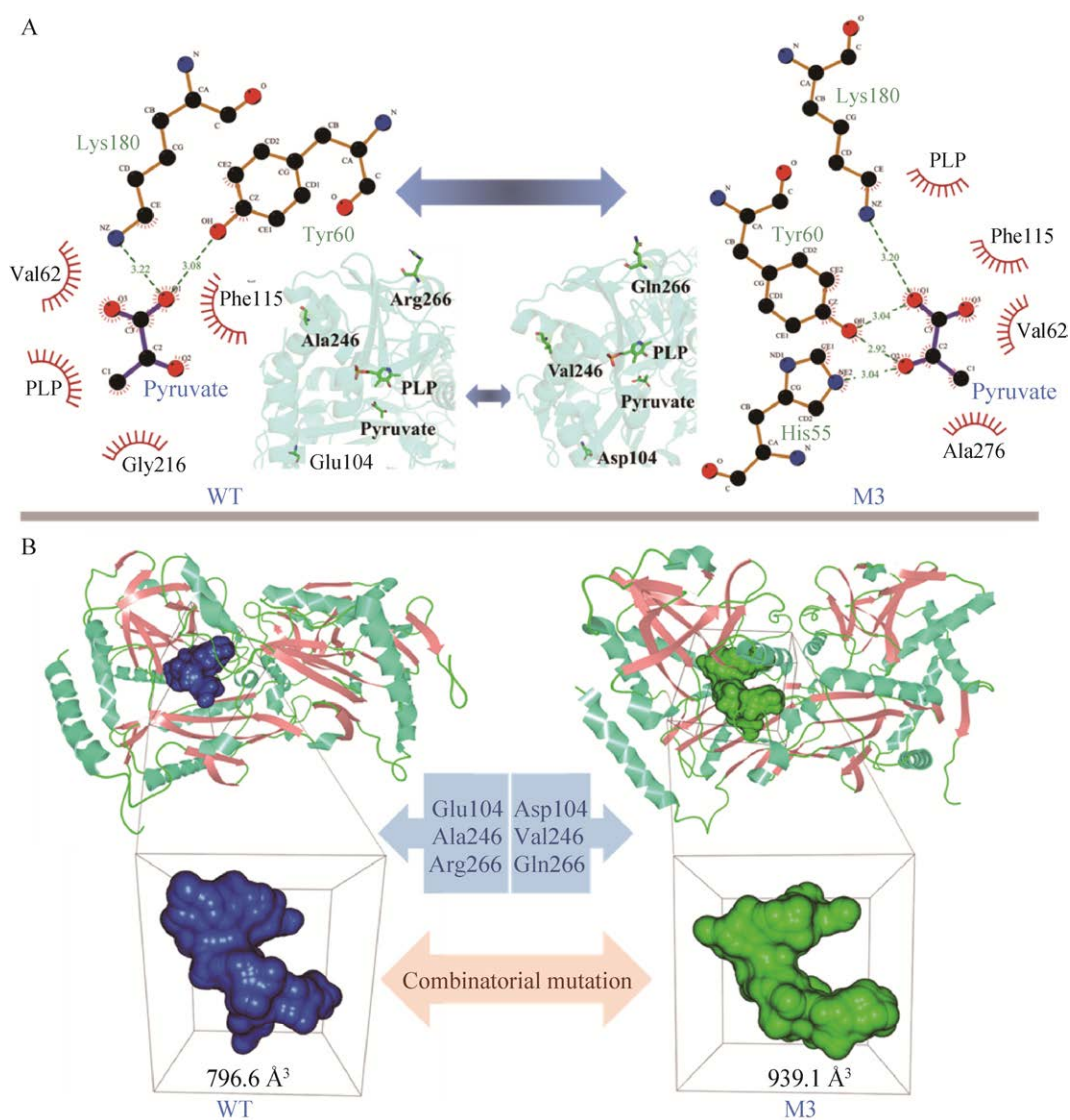


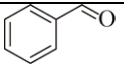
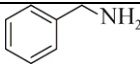
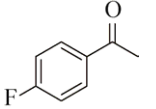
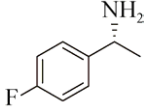
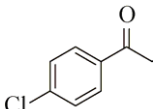
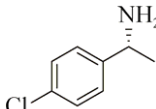
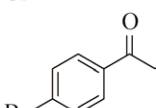
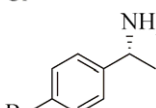
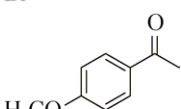
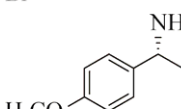
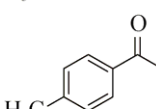
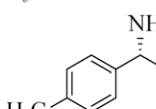
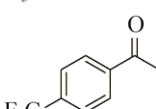
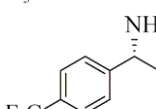
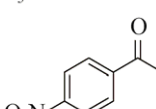
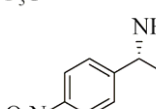
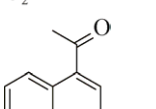
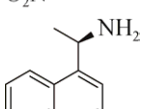
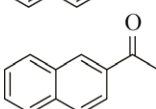
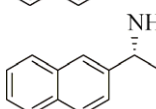
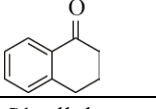
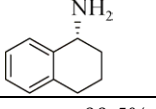
图 6 WT 及 M3 与底物分子对接分析 A: 底物分子丙酮酸与周围氨基酸的相互作用力. 绿色虚线为氢键; 红色发散状弧形为疏水相互作用. B: WT 与 M3 的底物结合口袋体积. 口袋体积计算使用软件 CAVER Analyst 2.0, 探针设置为 1.63 Å

Figure 6 Docking analysis of WT and M3 with substrate. A: The interactions between pyruvate and surrounding amino acids. Green dashed lines represent hydrogen bonds; Red diverging arcs represent hydrophobic interactions. B: Substrate binding pocket size of WT and M3. The volume of substrate binding pocket was calculated using CAVER Analyst 2.0 BETA and the probe was set as 1.63 Å.

与活性的同步提升。通过 YASARA 进行分子对接和动力学模拟分析, α -螺旋结构的加固、底物分子丙酮酸与周围氨基酸氢键的增加以及底物结合口袋体积的增大是 M3 较 WT 稳定性和

活性提升的原因。M3 也较 WT 对多种芳香酮类化合物表现出更加优良的催化效果, 这一结果表明 M3 在合成多种手性胺类化合物的应用方面具有更大潜力。

表 4 WT 和 M3 分别在 30 °C、40 °C 条件下催化各底物生成相应产物的产率与 *e.e.* 值Table 4 The yield and *e.e.* values of WT and M3 converting different substrates into corresponding products at 30 °C and 40 °C

Entry	Substrate	Product	The yield at 30 °C (%)		The yield at 40 °C (%)		<i>e.e.</i> (%) ^a
			WT	M3	WT	M3	
S1			82.55±0.58	91.73±2.32	81.53±1.14	87.89±0.22	–
S2			39.25±0.93	51.72±2.33	25.77±1.46	31.83±0.66	>99.5 (<i>R</i>)
S3			39.39±0.11	44.72±1.85	17.57±0.08	30.45±0.95	>99.5 (<i>R</i>)
S4			37.44±0.98	43.02±0.99	16.83±0.06	29.47±1.01	>99.5 (<i>R</i>)
S5			9.52±0.23	13.67±0.32	4.27±0.08	8.36±0.03	>99.5 (<i>R</i>)
S6			16.53±0.05	28.68±0.12	5.78±0.01	13.04±0.05	>99.5 (<i>R</i>)
S7			43.32±1.19	50.48±2.15	43.04±1.94	48.42±1.24	>99.5 (<i>R</i>)
S8			53.64±2.01	64.68±3.39	55.38±1.34	59.11±2.21	>99.5 (<i>R</i>)
S9			45.95±2.23	53.77±2.84	18.55±1.17	29.69±1.31	>99.5 (<i>R</i>)
S10			30.44±1.93	34.54±1.47	23.61±0.91	35.90±0.05	>99.5 (<i>R</i>)
S11			0.72±0.01	2.37±0.01	0.25±0.01	0.26±0.01	>99.5 (<i>R</i>)

^a: Except S1, all the *e.e.* values are >99.5% (*R*) at 30 °C and 40 °C whether WT or M3 is used.

REFERENCES

- [1] VITAKU E, SMITH DT, NJARDARSON JT. Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(24): 10257-10274.
- [2] FUCHS M, FARNBERGER JE, KROUTIL W. The industrial age of biocatalytic transamination[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015,

- 2015(32): 6965-6982.
- [3] KOHLS H, STEFFEN-MUNSBURG F, HÖHNE M. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 180-192.
- [4] BOMMARIUS AS. Amine dehydrogenases occur in nature[J]. *Nature Catalysis*, 2019, 2(4): 288-289.
- [5] GHISLIERI D, TURNER NJ. Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines[J]. *Topics in Catalysis*, 2014, 57(5): 284-300.
- [6] GAO GR, DU SZ, YANG Y, LEI X, HUANG HZ, CHANG MX. Direct asymmetric reductive amination for the synthesis of (*S*)-rivastigmine[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2207.
- [7] SAVILE CK, JANEY JM, MUNDORFF EC, MOORE JC, TAM S, JARVIS WR, COLBECK JC, KREBBER A, FLEITZ FJ, BRANDS J, DEVINE PN, HUISMAN GW, HUGHES GJ. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture[J]. *Science*, 2010, 329(5989): 305-309.
- [8] MARX L, RÍOS-LOMBARDÍA N, FARNBERGER JF, KROUTIL W, BENÍTEZ-MATEOS AI, LÓPEZ-GALLEGO F, MORÍS F, GONZÁLEZ-SABÍN J, BERGLUND P. Chemoenzymatic approaches to the synthesis of the calcimimetic agent cinacalcet employing transaminases and ketoreductases[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2018, 360(11): 2157-2165.
- [9] ABRAHAMSON MJ, VÁZQUEZ-FIGUEROA E, WOODALL NB, MOORE JC, BOMMARIUS AS. Development of an amine dehydrogenase for synthesis of chiral amines[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2012, 51(16): 3969-3972.
- [10] GHISLIERI D, GREEN AP, PONTINI M, WILLIES SC, ROWLES I, FRANK A, GROGAN G, TURNER NJ. Engineering an enantioselective amine oxidase for the synthesis of pharmaceutical building blocks and alkaloid natural products[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(29): 10863-10869.
- [11] LI H, LUAN ZJ, ZHENG GW, XU JH. Efficient synthesis of chiral indolines using an imine reductase from *Paenibacillus lactis*[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2015, 357(8): 1692-1696.
- [12] JONGKIND EPJ, FOSSEY-JOUENNE A, MAYOL O, ZAPARUCHA A, VERGNE-VAXELAIRE C, PAUL CE. Synthesis of chiral amines *via* a bi-enzymatic cascade using an ene-reductase and amine dehydrogenase[J]. *ChemCatChem*, 2022, 14(2): e202101576.
- [13] LIU L, WANG DH, CHEN FF, ZHANG ZJ, CHEN Q, XU JH, WANG ZL, ZHENG GW. Development of an engineered thermostable amine dehydrogenase for the synthesis of structurally diverse chiral amines[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2020, 10(8): 2353-2358.
- [14] MUTTI FG, FUCHS CS, PRESSNITZ D, TURRINI NG, SATTLER JH, LERCHNER A, SKERRA A, KROUTIL W. Amination of ketones by employing two new (*S*)-selective ω -transaminases and the His-tagged ω -TA from *Vibrio fluvialis*[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012(5): 1003-1007.
- [15] PARK E, KIM M, SHIN JS. One-pot conversion of L-threonine into L-homoalanine: biocatalytic production of an unnatural amino acid from a natural one[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2010, 352(18): 3391-3398.
- [16] MEHTA PK, HALE TI, CHRISTEN P. Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 214(2): 549-561.
- [17] SCHNEIDER G, KÄCK H, LINDQVIST Y. The manifold of vitamin B₆ dependent enzymes[J]. *Structure*, 2000, 8(1): R1-R6.
- [18] STEWART JD. Dehydrogenases and transaminases in asymmetric synthesis[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(2): 120-129.
- [19] YUN H, CHO BK, KIM BG. Kinetic resolution of (*R,S*)-*sec*-butylamine using ω -transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 under reduced pressure[J]. *Biotechnology Bioengineering*, 2004, 87(6): 772-778.
- [20] IWASAKI A, MATSUMOTO K, HASEGAWA J, YASOHARA Y. A novel transaminase, (*R*)-amine: pyruvate aminotransferase, from *Arthrobacter* sp. KNK168 (FERM BP-5228): purification, characterization, and gene cloning[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1563-1573.
- [21] IWASAKI A, YAMADA Y, KIZAKI N, IKENAKA Y, HASEGAWA J. Microbial synthesis of chiral amines by (*R*)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(5): 499-505.
- [22] HANSON R, DAVIS B, CHEN YJ, GOLDBERG S, PARKER W, TULLY T, MONTANA M, PATEL R.

- Preparation of (*R*)-amines from racemic amines with an (*S*)-amine transaminase from *Bacillus megaterium*[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2008, 350(9): 1367-1375.
- [23] QIU S, CHENG F, JIN LJ, CHEN Y, LI SF, WANG YJ, ZHENG YG. Co-evolution of activity and thermostability of an aldo-keto reductase *KmAKR* for asymmetric synthesis of statin precursor dichiral diols[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 103: 104228.
- [24] UNSWORTH LD, van der OOST J, KOUTSOPOULOS S. Hyperthermophilic enzymes-stability, activity and implementation strategies for high temperature applications[J]. *FEBS Journal*, 2007, 274(16): 4044-4056.
- [25] MUTTI FG, FUCHS CS, PRESSNITZ D, SATTLER JH, KROUTIL W. Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353(17): 3227-3233.
- [26] GONG XM, QIN Z, LI FL, ZENG BB, ZHENG GW, XU JH. Development of an engineered ketoreductase with simultaneously improved thermostability and activity for making a bulky atorvastatin precursor[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(1): 147-153.
- [27] SIDDIQUI KS. Defying the activity-stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(3): 309-322.
- [28] MODARRES HP, MOFRAD MR, SANATI-NEZHAD A. Protein thermostability engineering[J]. *RSC Advances*, 2016, 6(116): 115252-115270.
- [29] FINCH A, KIM J. Thermophilic proteins as versatile scaffolds for protein engineering[J]. *Microorganisms*, 2018, 6(4): 97.
- [30] MILLER SR. An appraisal of the enzyme stability-activity trade-off[J]. *Evolution*, 2017, 71(7): 1876-1887.
- [31] BIGMAN LS, LEVY Y. Proteins: molecules defined by their trade-offs[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2020, 60: 50-56.
- [32] SHAHID S, AHMAD F, HASSAN MI, ISLAM A. Relationship between protein stability and functional activity in the presence of macromolecular crowding agents alone and in mixture: an insight into stability-activity trade-off[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 584: 42-50.
- [33] SHOICHET BK, BAASE WA, KUROKI R, MATTHEWS BW. A relationship between protein stability and protein function[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(2): 452-456.
- [34] CAO XD, HAN RZ, FANG HH, NI Y. Engineering ω -transaminase by random mutagenesis and semi-rational design for the synthesis of (*R*)-(+)-1-(1-naphthyl)ethylamine[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(9): 1828-1837.
- [35] JIA DX, WANG F, ZHAO R, GU BD, PENG C, JIN LQ, LIU ZQ, ZHENG YG. Engineering novel (*R*)-selective transaminase for efficient symmetric synthesis of D-alanine[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(9): e0006222.
- [36] SCHÄTZLE S, HÖHNE M, REDESTAD E, ROBINS K, BORNSCHEUER UT. Rapid and sensitive kinetic assay for characterization of ω -transaminases[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(19): 8244-8248.
- [37] NIESEN FH, BERGLUND H, VEDADI M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(9): 2212-2221.
- [38] PURMONEN M, VALJAKKA J, TAKKINEN K, LAITINEN T, ROUVINEN J. Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 xylanases[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2007, 20(11): 551-559.
- [39] LI SF, XIE JY, QIU S, XU SY, CHENG F, WANG YJ, ZHENG YG. Semirational engineering of an aldo-keto reductase *KmAKR* for overcoming trade-offs between catalytic activity and thermostability[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(11): 4441-4452.

(本文责编 陈宏宇)