

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2022-027

蛋白质工程在饲料用酶研发中的应用研究进展

涂涛, 罗会颖, 姚斌

(动物营养学国家重点实验室, 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: 饲料用酶制剂作为饲料添加剂领域最为热门的研究热点之一, 以其无残留、无污染、无耐药性等强势优势被广泛推广和应用, 极大促进了饲料行业的健康发展。其中, 饲料用酶的催化性能是决定其应用功效的核心因素, 如何提高饲料用酶的综合性能是饲料用酶制剂研发过程中面临的关键科学问题之一。本文从饲料用酶的实际应用需求出发, 聚焦饲料用酶的热稳定性、pH 依赖性、蛋白酶抗性和催化活性等4个方面, 综述了计算机辅助的蛋白质理性设计技术在饲料用酶制剂研发中的应用研究进展, 介绍了用于提升饲料用酶催化性能的有效分子设计策略。通过蛋白质工程技术在关键饲料用酶制剂研发中的应用案例介绍, 展示了基于结构基础的酶分子设计技术在饲料用酶制剂研发中的应用前景。与此同时, 作为一种应用导向极强的饲料添加剂, 利用合成生物学的思想从酶蛋白全局角度出发综合提升饲料用酶催化性能的发展方向, 将推动饲料用酶制剂环境适应性分子设计的研发迈向新的台阶。

关键词: 饲料用酶; 蛋白质工程; 分子设计; 热稳定性; pH 依赖性; 蛋白酶抗性; 催化活性

中图分类号: Q816 **文献标志码:** A

Progress in the application of protein engineering in the developing of feed enzymes

TU Tao, LUO Huiying, YAO Bin

(State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: Feed enzymes are one of the hotspots for research in the field of feed additives. Because of their superior qualities of no residue, no pollution, and no drug resistance, feed enzymes have been widely promoted and applied in the feed industry. As functional additives, feed enzymes have tremendously fostered feed development. Since the catalytic performance of feed enzyme is the core factor in determining their application effectiveness, one of the primary challenges faced by scientists engaged in the R&D of feed enzymes is how to improve their overall performance. Based on the application requirement for feed enzymes, this review focuses on their thermal stability, pH

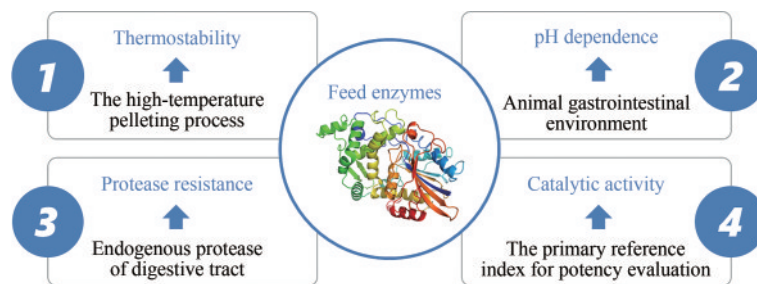
收稿日期: 2022-05-06 修回日期: 2022-05-28

基金项目: 国家重点研发计划青年科学家项目 (2021YFC2102400); 国家现代农业产业技术体系 (CARS-41)

引用本文: 涂涛, 罗会颖, 姚斌. 蛋白质工程在饲料用酶研发中的应用研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(3): 487-499

Citation: TU Tao, LUO Huiying, YAO Bin. Progress in the application of protein engineering in the developing of feed enzymes[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(3): 487-499

dependence, protease resistance, and catalytic activities. We summarize the application of computer-aided protein rational design technology in the R&D of feed enzymes, and introduce effective molecular design strategies for improving their catalytic performance. In addition, we present the progress in improving the performance of key feed enzymes by protein engineering technology, demonstrating the application prospect of enzyme molecular design technology based on the knowledge of protein structures. We also prospect the future development of protein engineering technology in feed enzymes, including (1) application-oriented designs for feed enzymes, (2) molecular design of multifunctional enzymes for efficient utilization of feed materials, (3) improvement of the thermostability as well as the catalytic performance of feed enzymes to meet the requirement of feed pelleting and under digestive and intestinal conditions, and (4) innovation and development of enzyme molecular design technology. Improving the catalytic performance of feed enzymes comprehensively from the perspective of enzyme proteins using synthetic biology tools will promote the development of the environmental adaptive molecular design of feed enzymes to a new stage.



Keywords: feed enzymes; protein engineering; molecular designing; thermostability; pH dependence; protease resistance; catalytic activity

蛋白质工程是指以蛋白质分子的结构规律及其生物功能的关系作为基础,采用理性设计、定向进化等技术手段,按照人们意志改变蛋白质的结构和功能或创造全新蛋白质的过程^[1]。作为合成生物学中的一门核心基础学科,蛋白质工程对于催化元件功能的靶向定制做出了重要贡献,在食品、轻工、医药、饲料等众多行业中广泛应用^[2]。饲料用酶制剂作为饲料添加剂领域最为热门的研究热点之一,以其无残留、无污染、无抗药性等强势优势被广泛推广和应用,极大促进了饲料行业的健康发展。在饲料中添加饲料用酶制剂,不仅可以补充内源消化酶的不足、降解饲料中抗营养因子,提高日粮营养的消化利用,而且还能调节肠道结构和功能,促进畜禽肠道健康,其应用效果已在世界范围内得到公认^[3]。目前,《饲料添加剂品种目录》中包含饲料用酶制剂14种,分别为淀粉酶、 α -半乳糖苷酶、纤维素酶、 β -葡聚

糖酶、葡萄糖氧化酶、脂肪酶、麦芽糖酶、 β -甘露聚糖酶、 β -半乳糖苷酶、果胶酶、植酸酶、蛋白酶、角蛋白酶、木聚糖酶。与其他酶制剂不同,这些饲料用酶在性能方面有着特殊的应用要求。第一,限于饲料加工制粒过程中瞬时高温的工艺要求,饲料用酶必须具有良好的热稳定性;而饲料用酶需要在畜禽体内发挥功能,因此又必须在生理温度下具有高活性。第二,作为饲料添加剂,饲料用酶需要在畜禽动物完整消化道中游离,因此饲料用酶必须在酸性到中性pH范围内具有高活性。第三,在胃液到肠道环境中存在胃蛋白酶、胰蛋白酶等消化酶,因此饲料用酶必须具有良好的内源性蛋白酶抗性。绝大多数饲料用酶的综合性能都不能完全满足上述三方面的要求,严重影响了饲喂效果,从而限制了其应用和发展。

随着蛋白质工程技术的跨越式发展,基因挖掘、结构解析、分子设计等系统生物学技术为饲

料用酶制剂的研发提供了广阔的知识与技术支持^[4]。利用蛋白质工程技术,基于结构基础来改造和设计饲料用酶的酶学性能,从而满足饲料工业的应用需求。本文聚焦饲料用酶的热稳定性、pH依赖性、蛋白酶抗性和催化活性等4个方面,综述了计算机辅助的蛋白质理性设计技术在饲料用酶制剂研发中的应用研究进展,并展望了未来饲料用酶制剂分子改良的重点方向。

1 热稳定性

饲料制粒加工条件通常为75~85 °C处理1 min左右,长时间的高温处理一方面会导致淀粉糊化、原料结构改变,另一方面也会使热敏性饲料添加剂失活^[5]。因此,饲料用酶在80 °C条件下短时间处理后的剩余酶活成为评价饲料用酶在热稳定性方面是否具有应用潜力的核心指标^[6]。随着结构生物学和生物信息学的迅速发展,基于结构基础的酶热稳定性理性设计准确率也得到了显著提升。表1列举了近几年中在酶热稳定性理性设计方面表现突出的软件。这些策略从不同角度优化了饲料用酶的结构构象,如氢键、盐键、二硫键、疏水核心等,从而实现局部作用网络乃至整体结构的

刚性增强,导致饲料用酶的热稳定性提高。例如,Dotsenko等^[21]利用PremPS和mCSM的计算方法对*Penicillium canescens*木聚糖酶E的自由能进行优化并指导设计了6个热稳定性突变体,经试验验证确认获得4个正突变体(A45V、S104M、E177P和A341P),它们的 T_m 值较野生型提高了1.1~3.1 °C,在70 °C下的半衰期较野生型提高了1.3~1.7倍。Navone等^[22]通过在大肠杆菌植酸酶AppA中引入二硫键(L28C/W360C)后,在不影响酶活的前提下(野生型和突变体的比活分别为1150 U/mg±138 U/mg和1273 U/mg±238 U/mg)使得其在85 °C条件下处理20 min后的剩余酶活由野生型的2%提高到47%。以上述研究结果为代表,一方面说明了以结构基础为指导的饲料用酶热稳定性设计准确率可观,但另一方面也提示表征饲料用酶热稳定性的参数很多,不同的研究者选用了不同的参数进行热稳定性研究,因此,有必要对热稳定性参数进行统一和细分。

事实上,酶热稳定性可以拆分为热力学稳定性和动力学稳定性两大类^[23]。热力学稳定性与酶蛋白折叠和解折叠构象间的平衡相关^[24],不同的热力学参数,如解折叠自由能(unfolding free energy, ΔG_u)、解折叠平衡常数(unfolding equilibrium constant, K_u)、解链温度(melting temperature, T_m)、变性浓

表1 用于酶热稳定性设计的软件总结

Tab. 1 Summary for the software used for designing thermo-toler enzymes

软件	描述	网址	参考文献
Consensus Finder	基于共识分析构建共识序列	http://kazlab.umn.edu/	[7]
Disulfide by Design 2.0	基于高B因子参数引入二硫键提高热稳定性	http://cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/	[8]
EASE-MM	综合多种机器学习模型预测点突变引起的稳定性变化	http://sparks-lab.org/server/ease-mm/	[9]
Eris	基于Medusa模型预测突变位点引起的蛋白质稳定性变化	https://dokhlab.med.psu.edu/eris/login.php	[10]
ETSS	基于酶表面电荷优化的策略		[11]
FireProt	基于能量和进化信息的热稳定性多点突变体设计	https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprot/	[12]
FoldX	基于折叠自由能计算酶不稳定区域	https://foldxsuite.crg.eu/	[13]
I-Mutant	基于神经网络预测单点突变引起的稳定性变化	https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html	[14]
mCSM	基于图形特征预测突变位点对蛋白质稳定性的影响	http://biosig.unimelb.edu.au/mcsm/stability	[15]
PoPMuSiC	基于突变位点的溶剂可及性预测其对蛋白质稳定性的影响	https://soft.dezyme.com/	[16]
PremPS	基于解折叠自由能的计算评估单点突变对对酶稳定性的影响	https://lilab.jysw.suda.edu.cn/research/PremPS/	[17]
Prethermut	基于机器学习的方法预测单点或多点突变引起的酶热稳定性变化	http://www.mobioinfor.cn/prethermut	[18]
PROSS	基于结构和序列的自动化蛋白质高表达和稳定性设计	http://pross.weizmann.ac.il	[19]
Rosetta	基于蒙特卡罗模拟退火的优化方法寻找突变位点提高蛋白质稳定性	https://www.rosettacommons.org/software	[20]

度 (denaturing concentration, C_m) 等都可以用来表征酶的热力学稳定性。而动力学稳定性与酶蛋白不可逆失活的速率有关, 表征参数如最适温度 (temperature of maximum enzymatic activity, T_{max})、半失活温度 (temperature at which 50% of the maximal activity of an enzyme is retained, T_{50})、半衰期 (half-life, $t_{1/2}$)、表观失活速率常数 (apparent inactivation rate constant, k_{obs}) 等^[25]。尽管酶蛋白的解折叠和失活存在一定关联度, 但它们是两个完全不同的过程。从应用角度来讲, 理想中的饲料用酶需要保持足够长时间的活性状态 (即动力学稳定性), 而不完全是在长时间内保持折叠状态 (即热力学稳定性)^[26]。而从计算设计角度来看, 通过表1中列举的不同策略优化饲料用酶的刚性结构, 能够直接改善的是饲料用酶热力学稳定性^[27-29] (图1)。这些饲料用酶的热力学稳定性提高后会导致其动力学稳定性有不同程度的提高, 二者的关联机制还有待进一步的深入研究。Tu等^[30]以嗜热多聚半乳糖醛酸酶为研究材料, 针对表面极性氨基酸进行丙氨酸扫描实验, 获得了一个显著影响酶动力学稳定性的突变体T284A。突变体T284A的 T_m 值与野生型相当 (仅低1.4 °C), 但是在60 °C下的 $t_{1/2}$ 由野生型的1242.7 min减少到41.6 min, 晶

体结构分析表明残基Thr284的羟基通过与Gln255的 $C\alpha$ 原子间形成一个碳氧氢键来稳定残基Gln255的侧链构象, 从而促进酶动力学稳定性提升。这一研究理论有效指导了该酶的热稳定性进一步提升, 在80 °C下的半衰期提高了15倍^[31], 达到了饲料用酶在热稳定性方面的应用要求。

除了计算策略本身的设计思路, 合成生物学中定量化、标准化和模块化的指导策略也在饲料用酶热稳定性分子改良中得到应用。Liu等^[32]以两个耐热性差异显著的 β -甘露聚糖酶 (最适温度分别为90 °C和70 °C, 序列一致性为73%) 为核心研究材料, 确定了N末端和C末端两个模块为 β -甘露聚糖酶热稳定性的重要影响区域。进一步针对N末端和C末端进行局部划分, 分别找到两个关键的氨基酸位点: 将N末端中的His112和Phe113位点分别突变为Tyr后, T_m 值提高了7.6 °C, 75 °C下的半衰期提高了7.5倍; 将C末端中的Leu375和Ala408位点分别突变为His和Pro后, T_m 值提高了5.6 °C, 75 °C下的半衰期提高了1.5倍。将上述4个位点进行组合突变后, 得到的四点突变体 T_m 值和75 °C下的半衰期分别较野生型提高了13.8 °C和89倍。类似的, Zheng等^[33]基于糖苷水解酶第5家族纤维素酶的 $\beta\alpha$ 八筒状结构进行拆分, 将每个 $\beta\alpha$

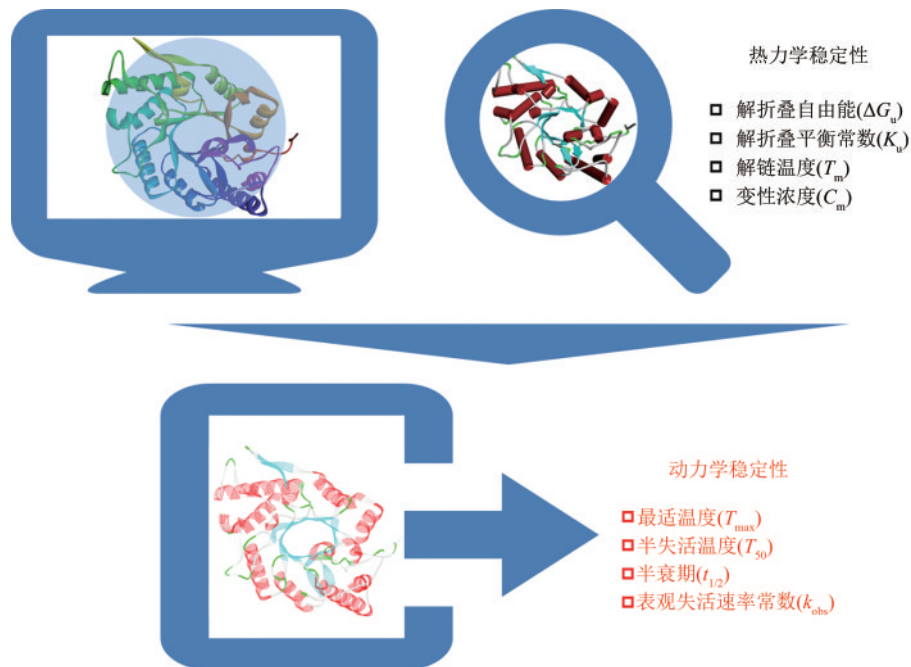


图1 计算机辅助的饲料用酶热稳定性分子设计

Fig. 1 Computer-aided molecular design for thermo-tolerant feeding enzymes

基序作为一个模块对两个热稳定性差异明显的纤维素酶（最适温度分别为90 °C和60 °C，序列一致性为51%）进行杂合组装，发现 $\beta 1\alpha 1$ 、 $\beta 2\alpha 2$ 和 $\beta 3\alpha 3$ 三组基序对纤维素酶的热稳定性起重要作用。与野生型相比，杂合酶的最适温度提高了20 °C， T_m 值提高了22.9 °C，55 °C下的半衰期提高了650倍。

针对饲料用酶这样的生物大分子，想要通过简单地突变一个或两个氨基酸来获得耐热性能满足饲料工业应用需求的突变体是不太现实的，合成生物学中全局调控的思路给饲料用酶的热稳定性分子改良指明了方向。Bu等^[34]采用FRESCO（framework for rapid enzyme stabilization by computational libraries）策略对木聚糖酶的热稳定性进行了理性设计。基于FoldX、Rosetta_ddg和ABACUS 3种算法从酶蛋白全局的角度对*Neocallimastix patriciarum*木聚糖酶进行能量计算，选取所有能量值降低的突变体组成虚拟突变体库（库容量为293）。然后，借助分子动力学模拟的技术手段对虚拟突变库中的突变体进行监测和评估，发现其中的188个突变体对木聚糖酶的稳定性会造成不利的影 响。因此，选择其余的105个突变体进行试验验证，获得了10个热力学稳定性显著提高（ $\Delta T_m > 1$ °C）的单点突变体，进一步组合突变后获得了一个四点突变体XynCDBFV-m，其 T_m 值和最适温度分别较野生型提高了14 °C和10 °C，提高幅度非常明显。葡萄糖氧化酶作为一种重要的抗生素替代用酶，可通过非药物性机制和途径杀菌抑菌，改善肠道微生态，是饲料用酶制剂中的明星酶种^[35-36]。然而，自然环境中筛选得到的葡萄糖氧化酶均属于中温酶，不能满足饲料用酶的耐热性能要求^[37]。因此，在没有嗜热酶作为参考模板的前提下，Tu等^[38-39]基于合成生物学中工程学的设计理念，综合了随机突变、酰胺基优化、疏水核心优化、蛋白表面电荷优化、N-糖基化修饰、辅基稳定、能量计算等多种策略对葡萄糖氧化酶的热稳定性进行定向进化研究，经过多角度的设计与改造，使得葡萄糖氧化酶的80 °C条件下处理2 min后的剩余酶活由野生型的完全丧失提高到80%，解决了该酶耐热性能差无法满足饲料工业应用的行业性瓶颈问题，目前该嗜热突变体已实现了产业化生产。

2 pH依赖性

饲料用酶需要在动物胃肠道内发挥作用。以家禽动物为例，鸡嗉囊、腺胃和肌胃的pH环境分别为4.5~5.5、3.7~3.9和2.0~2.2，而饲料在整个消化道食糜排空的时间为32 h^[40]。因此，饲料用酶的最适作用pH应该为酸性且在酸性胃液环境至肠道中性环境的范围内（pH 1.5~8.0）具有高活性。因此，最适pH值和酸稳定性是衡量饲料用酶在pH依赖性方面是否具有应用前景的重要依据^[41]。目前，人们普遍认为酶的最适pH值与其催化残基的 pK_a 值（酸度系数）大小紧密相关^[42]。于是，基于一些 pK_a 值预测软件如H++^[43]、CpHMD（continuous constant-pH molecular dynamics）^[44]、pKD^[45]、PROPKA^[46]等可有效改变饲料用酶催化残基 pK_a 值，进而实现饲料用酶pH依赖性的分子设计。例如，Cockburn等^[47]针对不同最适pH值的纤维素酶序列进行统计分析设计突变体，并利用H++和PROPKA软件评估突变位点对催化残基 pK_a 值变化的影响，获得了3个在pH5.0下活性显著提高的突变体。Wang等^[48]基于PROPKA的预测结果，对*Bacillus subtilis* α -淀粉酶催化残基周围0.45 nm以内的氨基酸进行设计，获得了3个最适pH值下降0.5~1.5个单位的突变体。Ludwiczek等^[49]针对*Bacillus circulans*木聚糖酶进行了更为大胆的尝试，直接将酸/碱亲核试剂残基Glu172突变为His以调整其 pK_a 值，成功将酶的最适pH值由5.6降低到4.7，但遗憾的是酶活力只剩余了8%。试验结果充分说明了催化残基的 pK_a 值大小直接决定了酶最适pH值的高低。

通常来讲，调整酶催化残基 pK_a 值的策略主要有3种（图2）：①基于静电作用原理在催化残基周围引入带负电荷氨基酸或带正电荷氨基酸从而提高或降低其 pK_a 值。②基于氢键作用网络通过催化残基作为氢受体或供体从而提高或降低其 pK_a 值。③基于疏水作用力通过催化残基的羧基基团去质子化从而提高其 pK_a 值。以具有典型的 β jelly-roll三维结构的糖苷水解酶第11和12家族木聚糖酶和葡聚糖酶为例^[50-51]。它们催化口袋中起酸/碱亲核试剂作用的催化残基周围存在一个最适pH依赖的关键氨基酸位点，在嗜酸饲料用酶中该位点为天

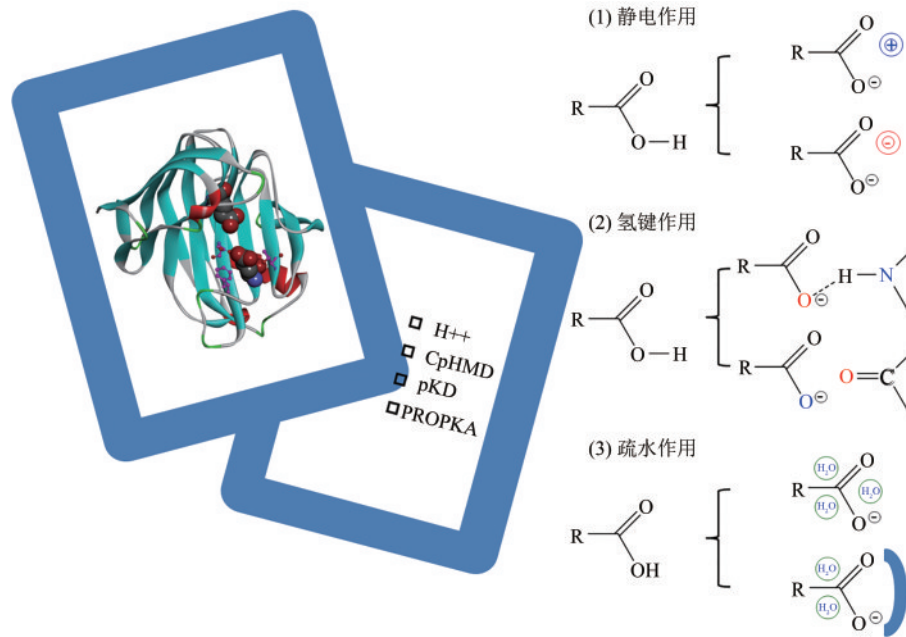


图2 调整饲料用酶催化残基 pK_a 值的3种策略^[42]

(1) 静电作用：在催化残基周围引入带负电荷氨基酸或带正电荷氨基酸从而提高或降低其 pK_a 值；(2) 氢键作用：通过催化残基作为氢受体或供体从而提高或降低其 pK_a 值；(3) 疏水作用：通过催化残基的羧基去质子化从而提高其 pK_a 值

Fig. 2 Strategies for adjusting the pK_a value of catalytic residues in feeding enzymes^[42]

(1) Electrostatic interactions: Introducing the negatively or positively charged amino acids around catalytic residues to increase or decrease the pK_a value; (2) Hydrogen-bond interactions: Acting as the hydrogen acceptor or donor of catalytic residues to increase or decrease the pK_a value; (3) Hydrophobic interactions: Deprotonation of the carboxyl group of catalytic residues to increase the pK_a value.

冬氨酸，在嗜中性饲料用酶中该位点则为天冬酰胺。将嗜酸饲料用酶中的天冬氨酸突变为天冬酰胺之后，可导致最适pH值升高（木聚糖酶突变体D37N最适pH值由2.8提高到5.5；葡聚糖酶突变体D98N最适pH值由4.0提高到5.1），反之相反。结构分析表明，嗜酸木聚糖酶中氨基酸Asp37侧链与酸/碱核试剂催化残基间形成稳定的氢键网络，当该氨基酸被突变为天冬酰胺后通过破坏氢键作用力从而改变了催化残基 pK_a 值，使得最适pH值升高。Pokhrel等^[52]尝试在*Bacillus circulans*木聚糖酶催化残基Glu72和Glu178周围引入带正电荷氨基酸Arg以降低催化残基的 pK_a 值，获得了4个最适pH值向酸性方向偏移0.5~1.5个单位的突变体。进一步，Li等^[53]利用高分辨率X射线晶体衍射技术、中子晶体学技术和CpHMD模拟技术对糖苷水解酶第11家族木聚糖酶pH依赖性的结构基础进行了研究，发现随着反应体系pH值的升高，氨基酸残基Y88与催化残基E177之间的氢键键长缩短，有力阻止了氨基酸E177的侧链向下旋转从而无法从水分子中获得质子高效反应。这一研究理

论将会有效指导饲料用酶的pH依赖性分子设计。

值得注意的是，尽管在酶催化口袋中催化残基的周围进行理性设计可以有效调节其 pK_a 值进而改变酶的最适pH值，但与此同时也会大幅度影响酶的催化活性^[54]，这对于饲料用酶的实际应用非常不利。因此，在酸性条件下保持稳定和高催化活性的饲料用酶pH依赖性分子设计策略仍旧是蛋白质工程研究领域的重点。Li等^[55]为了不影响酶催化活性，着眼于酶蛋白表面带负电荷的氨基酸进行理性设计，将5个酸性氨基酸均突变为Arg之后，最适pH值变化了2个单位，由4.5提高到了6.5，且催化效率提高了10.7倍。Xia等^[56]发现O-糖基化修饰严重影响了 β -葡萄糖苷酶的pH稳定性，将序列中O-糖基化特征基序突变后使得酶的耐受范围从pH 4.0~5.0拓展到pH 3.0~10.0，且底物转换数 k_{cat} 由 1664 s^{-1} 提高至 $1791\sim 2136\text{ s}^{-1}$ 。此外，Zhou等^[57]转换了研究思路，基于植酸酶的结构基础进行设计，以期将该酶的pH反应曲线向上平移，获得了4个在pH5.0条件下活性提高的突变体。Ma等^[58]利用人工神经网络结合Lasso线性回

归方法对糖苷水解酶第11家族木聚糖酶中影响最适pH值的氨基酸位点进行统计分析, 获取了8个正突变体, 它们的最适pH值较野生型相比向酸性方向偏移了0.5~0.75个单位, 酶活维持在野生型的80%以上。尽管这些策略均有效实现了饲料用酶的活性和pH依赖性双重设计, 但与酶稳定性的设计效果相比, 仍有较大提升空间。

3 蛋白酶抗性

在畜禽动物的消化胃肠道中, 会存在一些内源性蛋白酶, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶等。在饲料中添加饲料用酶制剂, 被畜禽动物食用进入消化道后, 抵抗内源性蛋白酶的降解特性成为了饲料用酶制剂的必要属性^[59]。这些内源蛋白酶对蛋白质的水解位点是保守的, 如胃蛋白酶倾向于剪切氨基端或羧基端为芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)或亮氨酸的肽键, 胰蛋白酶专一性识别Arg/Lys产生以Arg和Lys为碳末端残基的肽段。因此, 基于这些专一性的蛋白酶识别位点进行理性设计成为了首选策略, 试图通过消除蛋白酶的水解位点来增强饲料用酶抗内源性蛋白酶水解的能力(图3)。如Qiu等^[60]针对黄曲霉素解毒酶中所有的Arg和Lys残基展开分析, 选取位于酶蛋白表面的45个残基为靶标位点, 结合分子对接技术和分子动力学模拟技术设计出6个突变体并进行试验验证, 结果表明其中两个突变体(K213C/K244Q/K270T、R356E/K357T/R623C)抗胰蛋白酶水解能力较野生型分别提高了1.93倍和2.73倍。

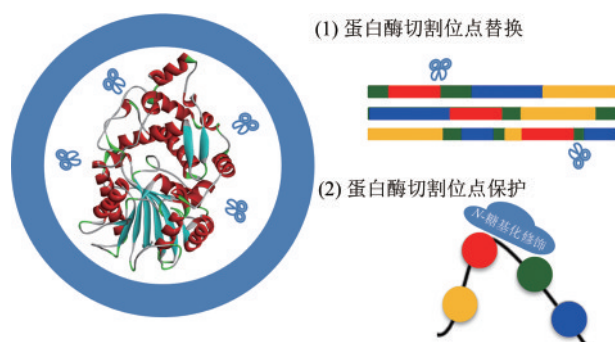


图3 饲料用酶对蛋白酶抗性的分子设计

Fig. 3 Design strategies for feed enzymes to resist the degradation of proteases

Niu等^[61-64]针对植酸酶的蛋白酶抗性分子设计展开了系统研究。首先, 以3个蛋白酶抗性差异显著的植酸酶(序列一致性为83%)为核心研究材料进行序列统计分析, 选择位于蛋白表面的Leu99、Leu162和Glu230 3个残基为候选突变热点^[61]。与胃蛋白酶敏感的野生型植酸酶YeAPPA相比, 突变体E230G抗胃蛋白酶降解的能力提高幅度高达447倍, 而且这一有益突变位点还显著提高了酶催化效率(2.1倍)和在pH 1.0~1.5条件下的稳定性(处理1 h后剩余酶活由野生型的63.7%~77.0%提高到92%以上)。随后, 该团队继续瞄准位于植酸酶表面的胃蛋白酶/胰蛋白酶切割位点进行分子设计^[62]。与胃蛋白酶敏感的野生型植酸酶YeAPPA相比, 3个突变体(F89S、K226H、F89S/K226H)抗胃蛋白酶降解的能力提高幅度高达228~447倍。将这一策略引入到 α -半乳糖苷酶的胃蛋白酶抗性分子设计中, 效果也非常明显^[63]。这一系列研究结果表明基于保护饲料用酶结构表面的内源性蛋白酶切割位点策略可有效增强饲料用酶抵抗蛋白酶水解的能力。基于这一结论, 该团队进一步尝试在植酸酶结构表面引入N-糖基化修饰从而阻断蛋白酶与其切割位点的接触, 以此达到抵抗蛋白酶水解的目的^[64]。通过在植酸酶YeAPPA蛋白表面引入N-糖基化修饰基序, 使得酶经过胃蛋白酶处理2 h后的剩余酶活由野生型的不到1.3%提高到了21.1%~32.1%以上。胃蛋白酶抗性能力显著增强的内在原因表现在两个方面: 一是N-糖基化修饰增强了酶在pH 1.0~2.0条件下的稳定性; 二是N-糖基化修饰有效阻止了胃蛋白酶与其切割位点的接触, 从而导致酶蛋白抵抗胃蛋白酶水解能力的提高。Hu等^[65]将该方法引入到 β -甘露聚糖酶对蛋白酶抗性的分子改造中, 获得的两个突变体g-347和g-123在经胃蛋白酶处理2 h后的剩余酶活由野生型的约50%提高到75%~85%。说明该方法对饲料用酶抵抗蛋白酶能力的分子设计具有一定的普适性效果。

Wang等^[66]基于酶束缚态形成的抑制过程建立了一套针对饲料用酶蛋白酶抗性的分子改造策略。选取 β -葡萄糖苷酶BGL1为研究材料, 通过预测分析BGL1与胃蛋白酶互作的复合物结构信息, 获取复合物构象中的关键氨基酸位点, 最后基于分子

动力学模拟技术优化并设计胃蛋白酶抗性突变体。实验结果表明：获得的两个突变体 Q627C 和 Q627C/R543H/R646W 的胃蛋白酶抗性半衰期较野生型分别提高了 1.36 倍和 1.51 倍，胰蛋白酶抗性半衰期较野生型分别提高了 0.93 倍和 1.53 倍。这一策略是前面蛋白酶抗性分子改造方法的有力补充，对饲料用酶蛋白酶抗性分子设计的通用性方法的建立提供了技术支撑。

4 催化活性

饲料用酶的催化活性是评价其效价的首要参考指标，决定了其应用成本。所以，酶的催化机理解析以及活性提升一直是酶学领域的热点研究问题^[67]。活性口袋是酶蛋白发挥催化功能的直接部位，基于活性口袋的分子设计成为了提高酶催化效率的有效手段^[68]。Tu 等^[69-71]针对多聚半乳糖醛酸酶的活性口袋展开了系统的研究。首先，基于多聚半乳糖醛酸酶晶体结构的构象分析、酶-六聚半乳糖醛酸底物分子对接结果和分子动力学模拟轨迹分析，研究了位于活性 T3 loop 区上的 Asn117 位点对于锚定底物的催化构象起到的关键作用^[69]。对该位点进行定点突变，导致底物转化数 k_{cat} 值由野生型的 $60\ 000\ s^{-1}$ 下降到 $3\sim 15\ 000\ s^{-1}$ ，说明活性 T3 loop 区对该酶催化效率的影响非常大。于是，该团队进一步对活性 T3 loop 区展开设计，试图提高该酶的催化活力^[70]。利用 CAVER3.0.2 软件对酶催化通道进行预测并结合活性 T3 loop 区的序列统计分析，找到非活性位点 Thr113，将该位点突变成 Lys 或 Arg 后可使得酶催化效率较野生型提高 28%~50%，其提升的分子机理为非活性位点 Thr113 的突变改变了活性 T3 loop 区的柔性进而影响了酶与底物之间的结合。在对多聚半乳糖醛酸酶与底物的分子动力学模拟时发现，在催化口袋内部活性 T3 loop 区上存在氨基酸残基 Asp129，其侧链羧基与 -2 位底物上的羧基通过一个 Na^+ 稳定^[71]。对该位点进行虚拟饱和和突变后并分别进行分子动力学模拟分析，发现将 Asp129 突变为 Lys 后其侧链可直接与底物结合，进一步试验结果表明结合力 k_s 值提高了 50%，酶催化效率提高了 4.7 倍。研究结果显示了活性 loop 区对调控酶的催

化效率发挥了重要作用。

与此同时，上述研究结果也说明针对催化口袋上的活性 loop 区进行分子设计，可有效改善酶的催化效率。Yang 等^[72]研究了活性 loop3 对糖苷水解酶第 12 家族催化效率的影响机理，较长的 loop3 可以加强酶-底物之间的氢键作用网络从而有利于酶解产物的释放。Zheng 等^[73]将该研究方法引入纤维素酶的催化效率分子改良研究中，将 loop6 上的残基 Asn233 突变成 Ala 或 Gly 后使得酶催化效率较野生型分别提高了 45% 和 52%。Yu 等^[74]等也借鉴此方法成功获得将内酯水解酶催化活力分别提高 2.9 倍和 3.4 倍的突变体。Singh 等^[75]利用该方法对糖苷水解酶第 5 家族葡聚糖酶进行分子设计，将 L11 loop 区上的 Asp256 突变为 Gly 使得酶催化效率提高了 22 倍。尽管基于活性 loop 区对酶的分子设计已得到了较好的研究进展，但是其完整功能的结构基础还需进一步研究，这也是基于活性 loop 区设计提升酶催化效率的前提。

随着研究的不断深入，人们逐渐发现酶的催化活性不仅仅受限于其催化口袋的影响。例如，Wang 等^[76]发现 *Bacillus subtilis* 木聚糖酶 XynLC9 的 N 末端残基可影响其催化效率，将残基 Trp6/Gln7 突变为 Phe/His、Asn8 突变为 Tyr 后可分别使得酶催化活性提高 2.6 倍和 1.8 倍。Dong 等^[77]在瘤胃木聚糖酶的 C 末端引入一段富含 Pro 的肽段之后使得嵌合酶的催化效率较野生型提高了 2.48 倍。Rubio 等^[78]发现了不同位点的 N-糖基化修饰对 *Aspergillus nidulans* 木糖苷酶 BxlB 催化活性的影响程度不同，其中 N5 位置的 N-糖基化修饰对提高酶催化活力起主要作用，而 N1 和 N7 位置的 N-糖基化修饰对提高酶催化活力起辅助作用。Zhang 等^[79]发现了不同的 linker 长度影响了 α -淀粉酶的催化活性，在野生型的基础上延长了 linker 长度使得酶催化效率提高了 67%，但进一步延长 linker 长度后，酶催化效率提升幅度变小，较野生型仅提高 43%。这一系列的研究结果表明，针对绿色、高效的饲料用酶蛋白催化反应机理还有待进一步的深入研究，除了酶蛋白直接与底物发生相互作用的催化口袋外，其他区域对酶催化活性的影响同样不可忽视。如 Kim 等^[80]发现了在 *Cryptopygus antarcticus* 甘露聚糖酶的结构表面存在底物二级结合位点 Trp147，

可通过 σ - π 键作用力锚定甘露五糖底物。

也正是因为影响酶蛋白结构构象的因素呈现多样化的特点,其综合性能也会表现出相互平衡调节的现象,最直观的体现是当酶稳定性得到提升时其催化活性会对应的损失。如Wang等^[81]对*Streptomyces* sp. S9木聚糖酶进行理性设计,获得了 T_m 值和70 °C下的 $t_{1/2}$ 提高7 °C和9倍的突变体,但该突变体的催化效率较野生型相比却下降了6.1倍。因此,借助合成生物学中全局调控的思路对饲料用酶的综合性能进行分子设计成为了当前的首选策略。如Min等^[82]针对糖苷水解酶第11家族木聚糖酶的结构柔性进行分析,重点围绕中温酶和嗜热酶的柔性区域差异进行设计,获得了催化效率提高7.51倍、构象稳定性提高0.7 °C的突变体。Ren等^[83]围绕碱性蛋白酶PROK的催化三联体周围1 nm范围的氨基酸残基,经过B因子、溶剂可接触、保守性等角度的综合设计,获得了催化活性较野生型提高20%、60 °C下稳定性明显提升的突变体。尽管这些有益探索取得了一定效果,但提升幅度仍有较大空间。

5 总结与展望

我国是畜禽养殖和饲料生产大国,2021年产饲料达2.93亿吨。饲料用酶制剂作为绿色、环保的饲料添加剂,在提高饲料利用率、降低饲料生产成本、减少环境污染物排放等多方面发挥了巨大作用。饲料用酶的催化性能是决定其应用功效的核心因素,直接关系到饲料用酶的效价。人们试图从环境中直接获取综合性能优良的饲料用酶基因,如Cheng等^[84]开发一个基于宏基因组测序结果快速获取目标基因的新策略。但限于绝大多数直接从自然环境中获得的饲料用酶综合性能都不能完全满足饲料用酶制剂在热稳定性、pH依赖性、蛋白酶抗性和催化活性等4方面的要求,因此,催化性能的提升是饲料用酶制剂研发过程中必不可少的一个研究环节。

随着结构生物学和生物信息学的快速发展,蛋白质工程技术在提升饲料用酶催化性能方面得到空前应用。如前所述,针对饲料用酶的催化活性和热稳定性的研究策略多样、提升效果相对明

显,且实现了二者同时提升的重大突破,显著提升了饲料用酶制剂的效价。如武汉新华扬生物股份有限公司先后推出的亮点产品赛乐植酸酶、耐热植酸酶、超级GOD4000、超级GOD10000等,既保证了饲料用酶的应用效果,保护了生态环境,也大大降低了饲料用酶制剂的生产成本,实现了经济效益、社会效益、生态效益“三赢”。尽管如此,在不影响酶活性的前提下对饲料用酶综合性能提升的分子设计依旧是未来的研究重点。如前所述,针对饲料用酶单一性能的分子改造技术已经有了非常好的研究进展,如何利用合成生物学的思想从酶蛋白全局角度出发以综合提升饲料用酶的催化性能,为蛋白质工程研究者们提出了巨大的挑战。

此外,饲料用酶作为一种应用导向极强的饲料添加剂,在蛋白质工程技术方面的发展方向主要有以下几点:一是秉承以应用效果为导向的饲料用酶分子设计。饲料原料中的组成成分是极其复杂的,除了主链多糖以外还存在大量的分支侧链多糖,因此基于单一组分标准底物设计的高催化活性饲料用酶突变体在实际应用场景中很难高效发挥作用。二是多功能酶的分子设计。除了多结构域多功能酶外,近年还发现了单结构域双功能酶以高效降解复杂底物的主链和侧链部分。如Cao等^[85]发现了一个单结构域双功能酶——乙酰酯酶/木糖苷酶,采用各自的催化口袋分别对木聚糖主链和侧链多糖进行水解,这为饲料原料的高效利用指明了新的方向。三是在重视饲料用酶的热稳定性研究的同时,需关注饲料用酶在生理体温下的活性。由于饲料制粒加工工艺的要求,热稳定性的提升一直是饲料用酶工程领域的持续研究热点,但最终饲料用酶是需要动物体内的胃肠道里发挥作用的。大多数酶热稳定性的设计结果是将其最适温度曲线向右平移,导致低温下的活性降低,而You等^[86]针对耐热木聚糖酶的loop区段进行设计,获得的有益突变体M173E/N269G最适温度曲线向上平移,在保证热稳定性提高的同时实现了低温条件下活性的提升。四是新技术的开发。酶分子设计技术的持续创新是饲料用酶不断发展的核心动力。如大数据人工智能技术已被应用于提高酶的蛋白表达量上^[87]。这些新技术

的实施有望推动饲料用酶制剂的研发迈向新的台阶。

参 考 文 献

- [1] SINHA R, SHUKLA P. Current trends in protein engineering: updates and progress[J]. *Current Protein & Peptide Science*, 2019, 20(5): 398-407.
- [2] PONGSUPASA V, ANUWAN P, MAENPUEN S, et al. Rational-design engineering to improve enzyme thermostability[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2397: 159-178.
- [3] 冯定远. 酶制剂在饲料养殖中发挥替代抗生素作用的领域及其机理[J]. *饲料工业*, 2020, 41(12): 1-10.
FENG D Y. The different fields and their mechanism of enzymes for replacing antibiotic in feeds and feeding[J]. *Feed Industry*, 2020, 41(12): 1-10.
- [4] VICTORINO DA SILVA AMATTO I, GONSALES DA ROSA-GARZON N, ANTÔNIO DE OLIVEIRA SIMÕES F, et al. Enzyme engineering and its industrial applications[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2022, 69(2): 389-409.
- [5] 范振港, 陈东, 王祚, 等. 粉碎、制粒工艺对饲料营养成分和单胃动物生产性能的影响[J]. *粮食与饲料工业*, 2020(1): 32-36.
FAN Z G, CHEN D, WANG Z, et al. Effects of crushing and pelletizing technology on nutrient composition of feed and production performance of monogastric animals[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2020(1): 32-36.
- [6] MRUDULA VASUDEVAN U, JAISWAL A K, KRISHNA S, et al. Thermostable phytase in feed and fuel industries[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 278: 400-407.
- [7] JONES B J, LIM H Y, HUANG J, et al. Comparison of five protein engineering strategies for stabilizing an α/β -hydrolase[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(50): 6521-6532.
- [8] CRAIG D B, DOMBKOWSKI A A. Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 346.
- [9] FOLKMAN L, STANTIC B, SATTAR A, et al. EASE-MM: Sequence-based prediction of mutation-induced stability changes with feature-based multiple models[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(6): 1394-1405.
- [10] YIN S Y, DING F, DOKHOLYAN N V. Eris: an automated estimator of protein stability[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(6): 466-467.
- [11] ZHANG L J, TANG X M, CUI D B, et al. A method to rationally increase protein stability based on the charge-charge interaction, with application to lipase LipK107[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2014, 23(1): 110-116.
- [12] KHAN R T, MUSIL M, STOURAC J, et al. Fully automated ancestral sequence reconstruction using FireProt^{ASR}[J]. *Current Protocols*, 2021, 1(2): e30.
- [13] SCHYMKOWITZ J, BORG J, STRICHER F, et al. The FoldX web server: an online force field[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W382-W388.
- [14] CAPRIOTTI E, FARISELLI P, CASADIO R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(s2): W306-W310.
- [15] PIRES D E V, ASCHER D B, BLUNDELL T L. mCSM: predicting the effects of mutations in proteins using graph-based signatures[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(3): 335-342.
- [16] DEHOUCK Y, KWASIGROCH J M, GILIS D, et al. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 151.
- [17] CHEN Y T, LU H Y, ZHANG N, et al. PremPS: Predicting the impact of missense mutations on protein stability[J]. *PLoS Computational Biology*, 2020, 16(12): e1008543.
- [18] TIAN J, WU N F, CHU X Y, et al. Predicting changes in protein thermostability brought about by single- or multi-site mutations[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 370.
- [19] 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.
- [20] KELLOGG E H, LEAVER-FAY A, BAKER D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability[J]. *Proteins*, 2011, 79(3): 830-838.
- [21] DOTSENKO A S, DENISENKO Y A, ROZHKOVA A M, et al. Enhancement of thermostability of GH10 xylanase E *Penicillium canescens* directed by $\Delta\Delta G$ calculations and structure analysis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 152: 109938.
- [22] NAVONE L, VOGL T, LUANGTHONGKAM P, et al. Disulfide bond engineering of AppA phytase for increased thermostability requires co-expression of protein disulfide isomerase in *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 80.
- [23] SANCHEZ-RUIZ J M. Protein kinetic stability[J]. *Biophysical Chemistry*, 2010, 148(1/2/3): 1-15.
- [24] CHAKRAVARTY A K, FNASc. Thermodynamic stability of biomolecules and evolution[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2017, 427: 8-9.
- [25] XIE Y, AN J, YANG G Y, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(11): 7994-8006.
- [26] CHADHA B S, KAUR B, BASOTRA N, et al. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current per-

- spective[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 277: 195-203.
- [27] WANG X C, YOU S P, ZHANG J X, et al. Rational design of a thermophilic β -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 to improve its thermostability[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2018, 118: 50-56.
- [28] NING X Y, ZHANG Y L, YUAN T T, et al. Enhanced thermostability of glucose oxidase through computer-aided molecular design[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 425.
- [29] LI G L, FANG X R, SU F, et al. Enhancing the thermostability of *Rhizomucor miehei* lipase with a limited screening library by rational-design point mutations and disulfide bonds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e02129-e02117.
- [30] TU T, WANG Z Y, LUO Y, et al. Structural insights into the mechanisms underlying the kinetic stability of GH28 endopolygalacturonase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(2): 815-823.
- [31] WANG S, MENG K, SU X Y, et al. Cysteine engineering of an endo-polygalacturonase from *Talaromyces leycettanus* JCM 12802 to improve its thermostability[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(22): 6351-6359.
- [32] LIU W N, TU T, GU Y, et al. Insight into the thermophilic mechanism of a glycoside hydrolase family 5 β -mannanase[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(1): 473-483.
- [33] ZHENG F, VERMAAS J V, ZHENG J, et al. Activity and thermostability of GH5 endoglucanase chimeras from mesophilic and thermophilic parents[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02079-e02018.
- [34] BU Y F, CUI Y L, PENG Y, et al. Engineering improved thermostability of the GH11 xylanase from *Neocallimastix patriciarum* via computational library design[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3675-3685.
- [35] 刘娇, 陈志敏, 郑爱娟, 等. 葡萄糖氧化酶对大肠杆菌攻毒肉鸭生长性能、免疫功能及肠道健康的影响[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(22): 4917-4930.
- LIU J, CHEN Z M, ZHENG A J, et al. Effects of glucose oxidase on growth performance, immune functions and intestinal health of ducks challenged by *Escherichia coli*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(22): 4917-4930.
- [36] LIANG Z Q, YAN Y R, ZHANG W, et al. Review of glucose oxidase as a feed additive: production, engineering, applications, growth-promoting mechanisms, and outlook[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022. DOI: 10.1080/07388551.2022.2057275.
- [37] LIU Z M, YUAN M X, ZHANG X Y, et al. A thermostable glucose oxidase from *Aspergillus heteromorphus* CBS 117.55 with broad pH stability and digestive enzyme resistance[J]. *Protein Expression and Purification*, 2020, 176: 105717.
- [38] TU T, WANG Y, HUANG H Q, et al. Improving the thermostability and catalytic efficiency of glucose oxidase from *Aspergillus niger* by molecular evolution[J]. *Food Chemistry*, 2019, 281: 163-170.
- [39] JIANG X, WANG Y R, WANG Y, et al. Exploiting the activity-stability trade-off of glucose oxidase from *Aspergillus niger* using a simple approach to calculate thermostability of mutants[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128270.
- [40] 胡炜恒, 郑文才, 廖星毅, 等. 益生菌有机酸复合添加剂对AA肉鸡血清生化指标和消化道pH值的影响[J]. *广东饲料*, 2014, 23(12): 30-34.
- HU W H, ZHENG W C, LIAO X Y, et al. Effects of probiotic organic acid compound additive on serum biochemical indices and digestive pH value of AA broilers[J]. *Guangdong Feed*, 2014, 23(12): 30-34.
- [41] ABBASI KHEIRABADI M, SAFFAR B, HEMMATI R, et al. Thermally stable and acidic pH tolerant mutant phytases with high catalytic efficiency from *Yersinia intermedia* for potential application in feed industries[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2022, 29(22): 33713-33724.
- [42] LI S F, CHENG F, WANG Y J, et al. Strategies for tailoring pH performances of glycoside hydrolases[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021: 1-21. DOI: 10.1080/07388551.2021.2004084.
- [43] ANANDAKRISHNAN R, AGUILAR B, ONUFRIEV A V. H++ 3.0: Automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(W1): W537-W541.
- [44] MONGAN J, CASE D A, MCCAMMON J A. Constant pH molecular dynamics in generalized Born implicit solvent[J]. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, 25(16): 2038-2048.
- [45] TYNAN-CONNOLLY B M, NIELSEN J E. Redesigning protein pK_a values[J]. *Protein Science*, 2007, 16(2): 239-249.
- [46] ROSTKOWSKI M, OLSSON M H M, SØNDERGAARD C R, et al. Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA[J]. *BMC Structural Biology*, 2011, 11: 6.
- [47] COCKBURN D W, CLARKE A J. Modulating the pH-activity profile of cellulase A from *Cellulomonas fimi* by replacement of surface residues[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2011, 24(5): 429-437.
- [48] WANG C H, LIU X L, HUANG R B, et al. Enhanced acidic adaptation of *Bacillus subtilis* Ca-independent α -amylase by rational engineering of pK_a values[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 139: 146-153.
- [49] LUDWICZEK M L, D'ANGELO I, YALLOWAY G N, et al. Strategies for modulating the pH-dependent activity of a family 11 glycoside hydrolase[J]. *Biochemistry*, 2013, 52(18): 3138-3156.
- [50] FUSHINOBU S, UNO T, KITAOKA M, et al. Mutational anal-

- ysis of fungal family 11 xylanases on pH optimum determination[J]. *Journal of Applied Glycoscience*, 2011, 58(3): 107-114.
- [51] TISHKOV V I, GUSAKOV A V, CHERKASHINA A S, et al. Engineering the pH-optimum of activity of the GH12 family endoglucanase by site-directed mutagenesis[J]. *Biochimie*, 2013, 95(9): 1704-1710.
- [52] POKHREL S, JOO J C, YOO Y J. Shifting the optimum pH of *Bacillus circulans* xylanase towards acidic side by introducing arginine[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2013, 18(1): 35-42.
- [53] LI Z H, ZHANG X S, WANG Q Q, et al. Understanding the pH-dependent reaction mechanism of a glycoside hydrolase using high-resolution X-ray and neutron crystallography[J]. *ACS Catalysis*, 2018, 8(9): 8058-8069.
- [54] LI H, TURUNEN O. Effect of acidic amino acids engineered into the active site cleft of *Thermopolyspora flexuosa* GH11 xylanase[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, 62(4): 433-440.
- [55] LI Q F, JIANG T, LIU R, et al. Tuning the pH profile of β -glucuronidase by rational site-directed mutagenesis for efficient transformation of glycyrrhizin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(12): 4813-4823.
- [56] XIA W, XU X X, QIAN L C, et al. Engineering a highly active thermophilic β -glucosidase to enhance its pH stability and saccharification performance[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 147.
- [57] ZHOU S J, LIU Z M, XIE W C, et al. Improving catalytic efficiency and maximum activity at low pH of *Aspergillus niger* phytase using rational design[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 131: 1117-1124.
- [58] MA F Q, XIE Y, LUO M J, et al. Sequence homolog-based molecular engineering for shifting the enzymatic pH optimum[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2016, 1(3): 195-206.
- [59] NIU C F, YANG P L, YAO B. Engineering protease-resistant and highly active phytases[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2091: 155-162.
- [60] QIU Y X, WU X Y, XIE C F, et al. A rational design for improving the trypsin resistance of aflatoxin-detoxifzyme (ADTZ) based on molecular structure evaluation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 86: 84-92.
- [61] NIU C F, YANG P L, LUO H Y, et al. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42133.
- [62] NIU C F, YANG P L, LUO H Y, et al. Engineering of *Yersinia* phytases to improve pepsin and trypsin resistance and thermostability and application potential in the food and feed industry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(34): 7337-7344.
- [63] NIU C F, WAN X Y. Engineering a trypsin-resistant thermophilic α -galactosidase to enhance pepsin resistance, acidic tolerance, catalytic performance, and potential in the food and feed industry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(39): 10560-10573.
- [64] NIU C F, LUO H Y, SHI P J, et al. *N*-glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(4): 1004-1014.
- [65] HU W X, LIU X Y, LI Y F, et al. Rational design for the stability improvement of *Armillariella tabescens* β -mannanase MAN47 based on *N*-glycosylation modification[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 97: 82-89.
- [66] WANG H, LIN X N, LI S, et al. Rational molecular design for improving digestive enzyme resistance of β -glucosidase from *Trichoderma viride* based on inhibition of bound state formation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2020, 133: 109465.
- [67] GOLDSMITH M, TAWFIK D S. Enzyme engineering: reaching the maximal catalytic efficiency peak[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 47: 140-150.
- [68] PINTO G P, CORBELLA M, DEMKIV A O, et al. Exploiting enzyme evolution for computational protein design[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2022, 47(5): 375-389.
- [69] TU T, MENG K, LUO H Y, et al. New insights into the role of T3 loop in determining catalytic efficiency of GH28 endo-polygalacturonases[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0135413.
- [70] TU T, PAN X, MENG K, et al. Substitution of a non-active-site residue located on the T3 loop increased the catalytic efficiency of endo-polygalacturonases[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(9): 1230-1238.
- [71] TU T, LI Y Q, LUO Y, et al. A key residue for the substrate affinity enhancement of a thermophilic endo-polygalacturonase revealed by computational design[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(10): 4457-4466.
- [72] YANG H, SHI P J, LIU Y, et al. Loop 3 of fungal endoglucanases of glycoside hydrolase family 12 modulates catalytic efficiency[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(6): e03123-16.
- [73] ZHENG F, TU T, WANG X Y, et al. Enhancing the catalytic activity of a novel GH5 cellulase Gt Cel5 from *Gloeophyllum trabeum* CBS 900.73 by site-directed mutagenesis on loop 6[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 76.
- [74] YU X R, TU T, LUO H Y, et al. Biochemical characterization and mutational analysis of a lactone hydrolase from *Phialophora americana*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2570-2577.
- [75] SINGH S, KUMAR K, NATH P, et al. Role of glycine 256 residue in improving the catalytic efficiency of mutant endoglucanase of family 5 glycoside hydrolase from *Bacillus amylolique*

- faciens* SS35[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(9): 2668-2682.
- [76] WANG L J, CAO K, PEDROSO M M, et al. Sequence- and structure-guided improvement of the catalytic performance of a GH11 family xylanase from *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 297(5): 101262.
- [77] DONG R Y, LIU X Q, WANG Y R, et al. Fusion of a proline-rich oligopeptide to the C-terminus of a ruminal xylanase improves catalytic efficiency[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10482-10492.
- [78] RUBIO M V, TERRASAN C R F, CONTESINI F J, et al. Re-designing *N*-glycosylation sites in a GH3 β -xylosidase improves the enzymatic efficiency[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 269.
- [79] ZHANG D D, TU T, WANG Y, et al. Improving the catalytic performance of a *Talaromyces leycettanus* α -amylase by changing the linker length[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(24): 5041-5048.
- [80] KIM M K, AN Y J, SONG J M, et al. Structure-based investigation into the functional roles of the extended loop and substrate-recognition sites in an endo- β -1,4-D-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*[J]. *Proteins*, 2014, 82(11): 3217-3223.
- [81] WANG K, LUO H Y, TIAN J, et al. Thermostability improvement of a streptomyces xylanase by introducing proline and glutamic acid residues[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(7): 2158-2165.
- [82] MIN K, KIM H, PARK H J, et al. Improving the catalytic performance of xylanase from *Bacillus circulans* through structure-based rational design[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125737.
- [83] REN Y X, LUO H Y, HUANG H Q, et al. Improving the catalytic performance of Proteinase K from *Parangyodontium album* for use in feather degradation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 154: 1586-1595.
- [84] CHENG L, QI C L, YANG H X, et al. gutMGene: a comprehensive database for target genes of gut microbes and microbial metabolites[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D795-D800.
- [85] CAO H, SUN L C, HUANG Y, et al. Structural insights into the dual-substrate recognition and catalytic mechanisms of a bifunctional acetyl ester-xyloside hydrolase from *Caldicellulosiruptor lactoaceticus*[J]. *ACS Catalysis*, 2019, 9(3): 1739-1747.
- [86] YOU S, LI J, ZHANG F, et al. Loop engineering of a thermostable GH10 xylanase to improve low-temperature catalytic performance for better synergistic biomass-degrading abilities[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 125962.
- [87] DING Z D, GUAN F F, XU G S, et al. MPEPE, a predictive approach to improve protein expression in *E. coli* based on deep learning[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2022, 20: 1142-1153.



通讯作者：姚斌(1967—)，男，博士，研究员。研究方向为饲料用酶。
E-mail: yaobin@caas.cn



第一作者：涂涛(1988—)，男，博士，副研究员。研究方向为饲料用酶工程。
E-mail: tutao@caas.cn