

## 动态残基网络社团视角下的木聚糖酶耐热性分析

冯一诚<sup>1)</sup>, 胡凯惠<sup>1)</sup>, 李心羽<sup>1)</sup>, 王馨颖<sup>1)</sup>, 丁彦蕊<sup>2)</sup>\*

(<sup>1)</sup> 江南大学 人工智能与计算机学院数字媒体技术系, 江苏 无锡 214122;

(<sup>2)</sup> 江南大学 理学院信息与计算科学系, 江苏 无锡 214122)

**摘要** 木聚糖酶在食品、饲料、造纸和纺织等行业有重要的应用, 研究木聚糖酶的耐热性有助于挖掘其潜在的应用领域并提高经济价值。本文通过采用 Louvain 算法, 对来自变铅青链霉菌的常温木聚糖酶(xyna\_strli)和嗜热子囊菌的耐热木聚糖酶(xyna\_theau)的动态残基相互作用网络进行社团检测, 并分析社团演化与木聚糖酶耐热性的关系。结果表明: 常温木聚糖酶的末端存在稳定相互作用; 以 GLU37 和 LEU5 为中心的残基结构稳固了酶的结构。耐热木聚糖酶中,  $\alpha 8'$ 、 $\alpha 8''$  上的相互作用提升了酶的热稳定性。通过分析稳定社团发现, 稳定社团包含酶的末端通过稳定相互作用提高耐热性。相较于常温木聚糖酶, 耐热木聚糖酶的稳定社团维持了更多短螺旋和柔性区域的稳定, 其在活性位点 GLU237 附近的残基减少了活性位点与底物接触, 提升了稳定性。

**关键词** 木聚糖酶; 动态残基网络; 耐热性; 演化社团; Louvain 算法

中图分类号 Q71

## Analysis of the Xylanase Thermostability from the Perspective of Dynamic Residue Network Community

FENG Yi-Cheng<sup>1)</sup>, HU Kai-Hui<sup>1)</sup>, LI Xin-Yu<sup>1)</sup>, WANG Xin-Ying<sup>1)</sup>, DING Yan-Rui<sup>2)</sup>\*

(<sup>1)</sup> Department of Digital Media Technology, School of Artificial Intelligence and Computer Science, Jiangnan University,

Wuxi 214122, Jiangsu, China; (<sup>2)</sup> Department of Information and Computational Science, School of Science,

Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract** Xylanase has important applications in food, feed, paper making, textile and so on. The study on the heat resistance of xylanase is helpful to explore its potential application fields and improve its economic values. In this paper, we used the Louvain algorithm to detect the dynamic residual interaction network of the *Streptomyces lividans* xylanase (xyna\_strli) and the *Thermotable aurantiacus* xylanase (xyna\_theau). And the relationship between the evolution of the communities and the thermal stability of the xylanase was analyzed. The results showed that the terminal of xyna\_strli has stable interaction; the residues centered on GLU37 and LEU5 stabilized the structure of enzyme. In xyna\_theau, the thermal stability of the enzyme was enhanced by the interaction between  $\alpha 8'$  and  $\alpha 8''$ . By analyzing the stable communities, it was found that the ends of the enzymes contained in the stable communities improved the thermal stability through the stable interaction. Compared with xyna\_strli, the stable community of xyna\_theau maintained the stability of more short helices and more flexible regions, and its residues near GLU237 of the active site reduced the contact between the active site and the substrate and improved the stability.

**Key words** xylanase; dynamic residue network; thermostability; evolution society; Louvain algorithm

收稿日期: 2020-06-09; 修回日期: 2020-07-13; 接受日期: 2020-08-31

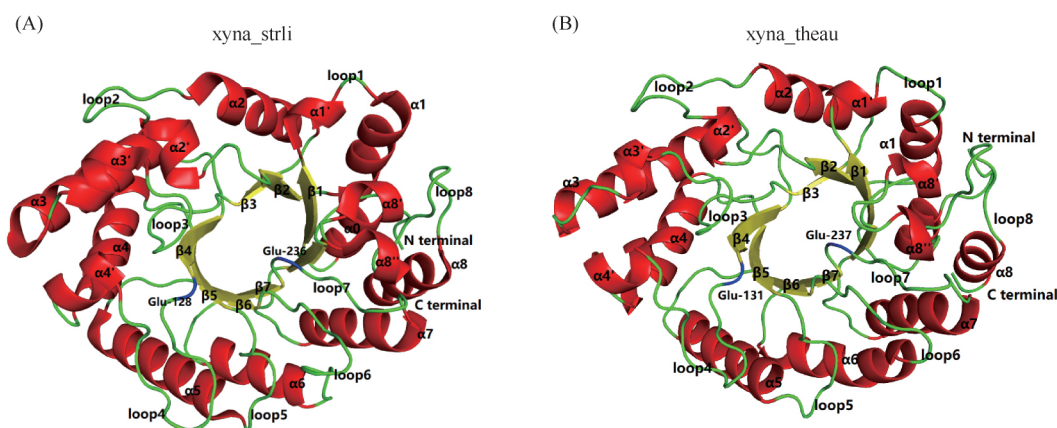
国家自然科学基金项目 (No. 21541006) 资助

\* 通讯作者 Tel: 18961727448; E-mail: yr\_ding@jiangnan.edu.cn

Received: June 9, 2020; Revised: July 13, 2020; Accepted: August 31, 2020

Supported by National Natural Science Foundation of China (No.21541006)

\* Corresponding author Tel: 18961727448; E-mail: yr\_ding@jiangnan.edu.cn



**Fig.1 Three-dimensional structure** (A) Three-dimensional structure of xyna\_strli. (B) Three-dimensional structure of xyna\_theau

木聚糖酶在食品、饲料、造纸和纺织等行业有重要的应用<sup>[1,2]</sup>。工业加工过程中的高温高湿环境要求木聚糖酶在高温下能保持高活性,而天然木聚糖酶耐热性普遍较差。因此对木聚糖酶耐热性的研究是必要的,木聚糖酶的热稳定性也成为蛋白质工程领域中的关注重点,对其耐热性的研究能提升经济效益以及工业生产效率。其中,通过分子生物学方法改造木聚糖酶的耐热性引起了人们的广泛关注<sup>[3,4]</sup>。改造木聚糖酶耐热性的方法众多。例如,增加 N-C 端之间的相互作用<sup>[5]</sup>、切除 N 端或 C 端部分多肽<sup>[6]</sup>、增加氢键<sup>[7]</sup>以及盐桥<sup>[3]</sup>等。由于蛋白质是由残基-残基之间相互作用构成的复杂系统,利用复杂网络理论探究木聚糖酶空间结构与其耐热性的关系是一种有效方式<sup>[8]</sup>。

在残基相互作用网络中,每个残基是一个网络节点,残基之间的相互作用是网络的边。网络中的社团结构体现了蛋白质中局部紧密的相互作用,通常与蛋白质功能有关<sup>[9,10]</sup>。目前,常用的社团检测算法有 K-means 算法、GN 算法、Louvain 算法和谱聚类等。这些算法已经被普遍运用到社交网络、商业选址、生物基因等方面。动态网络能够反映随着时间演变外界因素对蛋白质构象的影响,是进行蛋白质结构功能研究的有效方法<sup>[11,12]</sup>。以往研究者都致力于分析静态残基相互作用网络,但是这样会忽略蛋白质随温度、时间等外界因素变化的动态因素,因此构建动态残基相互作用网络并挖掘动态特征成为研究木聚糖酶耐热性的必要途径。Yang 等<sup>[13]</sup>通过基于时间序列关联和蚁群聚类的方法来识别动态蛋白质网络中的蛋白质复合物。Stetz 等<sup>[11]</sup>利用动态残基相互作用网络模型,证明了底物结合能促进有效的变构通讯,并发现了蛋白质变构结构转变的

动态和进化因素。本文以木聚糖酶的动态残基相互作用网络为研究对象,通过社团检测算法,研究社团演化对木聚糖酶热稳定性的影响。

本文研究对象为来自变铅青链霉菌常温木聚糖酶(streptomyces lividans xylanase xyna\_strli)和嗜热子囊菌耐热的木聚糖酶(thermoascus aurantiacus xylanase xyna\_theau),两者均为木聚糖酶家族 10 的成员, Fig.1 是 xyna\_strli 和 xyna\_theau 的三维结构图。通过 Louvain 算法对残基相互作用网络进行社团检测,然后使用基于相邻时刻相似度比较的方式进行社团的演化分析。对保持时间最长的社团(即稳定社团)进行分析,挖掘影响木聚糖酶耐热性的结构协同作用,并研究木聚糖酶耐热性的影响因素。

## 1 材料与方法

### 1.1 木聚糖酶残基相互作用网络的社团挖掘

xyna\_strli 和 xyna\_theau 的残基相互作用网络来自 Zhang 等的论文<sup>[14]</sup>。

对于 300 ns 时间序列上的动态残基相互作用网络,每隔 15 帧选择 1 帧作为关键帧,共获得 21 个关键帧。对于 21 个关键帧网络,采用 Louvain 算法进行社团检测,以此来挖掘木聚糖酶内部残基-残基之间的协同关系。Louvain 算法是基于社团模块度  $Q$  的社团检测算法,它通过模块度  $Q$  来衡量一个社团的紧密程度,使得节点的加入能够最大程度地增加模块度  $Q$ 。模块度  $Q$  的计算公式为:

$$Q = \frac{1}{2W_{e\_all}} \sum_c W_{c\_in} - \frac{W_c^2}{2W_{e\_all}}$$

其中,  $W_{e\_all}$  代表网络中所有边的权重之和,  $W_{c\_in}$  表社团  $c$  内的边的权重之和,  $W_c$  代表社团  $c$  内边权重和加上社团  $c$  与其他社团连边权重和。

当残基  $i$  加入到某一社团中,该社团的  $\Delta Q$  表达式为:

$$\Delta Q = \frac{1}{2W_{e\_all}} \left[ W_{in\_i} - \frac{W_c W_i}{W_{e\_all}} \right]$$

其中,  $W_{in\_i}$  社团内残基节点与残基节点  $i$  连边的权重之和,  $W_i$  代表网络中与残基节点  $i$  相连边的权重之和。

Louvain 算法聚类过程如 Fig.2 所示,具体步骤为:

(a) 初始时将残基相互作用网络中的每个残基节点视为一个社团。

(b) 遍历网络中的残基节点,将单个节点加入到能使得模块度  $Q$  有最大增量的社团中。

(c) 将属于同一社团的残基节点合并为一个超节点,这些新生成的超节点作为网络中的新节点。

(d) 不断迭代 (b) (c) 步骤,直至模块度  $Q$  稳定。

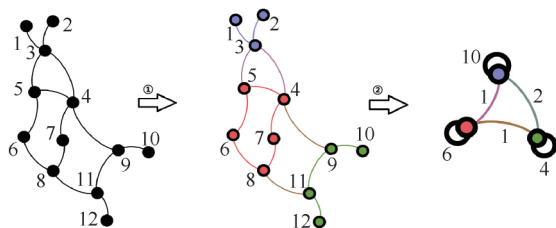


Fig.2 Visualization of steps of Louvain algorithm

The community of each node is represented by different colors. And the number near the node represents the node ordinal number, and the number near the edge represents the weight of the edge

## 1.2 基于相邻时刻社团相似度比较的社团演化分析

社团演化主要包括延续、新生、死亡、合并和分裂<sup>[15]</sup>等基本事件,正如 Fig.3 所示。

对 xyna\_strli 和 xyna\_theau 的残基相互作用网络进行社团检测后,进一步通过基于社团相似度比较的方法进行社团演化分析。令  $t$  时刻下所有的残基社团集合为  $C_t$ ,  $C_t = \{c_{t1}, c_{t2}, \dots, c_{tn}\}$ , 其中  $c_{tn}$  是  $t$  时刻所有残基社团中的序号为  $n$  的社团。同时,令所有残基的社团演化的序列的集合为  $Y$ ,  $Y_i$  为序号为  $i$  的社团的演化。具体步骤如下<sup>[15]</sup>:

(a) 初始化时,取第 1 个时间帧(即  $t=0$ ),将  $C_1$  集合下的各个残基社团加入  $Y$  中,此时

$$Y = \{c_{01}, c_{02}, \dots, c_{0n}\}。$$

(b) 对于接下来每个  $c_{tn} \in C_t$ , 将  $c_{tn}$  与社团演化的序列集合  $Y$  中每一个仍然存活的序列(即该社团

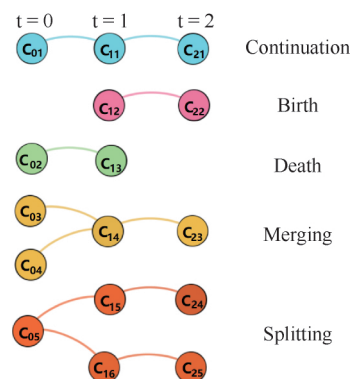


Fig.3 The fundamental events of community evolution

The community of each node is represented by different colors and each column corresponds to one moment in evolution

演化序列从新生开始到目前时刻未曾停止演化)的最后一个社团  $O$  进行相似度比较。其中,相似度  $S(c_{tn}, O)$  为两个社团的 Jaccard 系数:

$$S(c_{tn}, O) = \frac{|c_{tn} \cap O|}{|c_{tn} \cup O|}$$

对于  $S(c_{tn}, O) > \theta$  ( $\theta$  为相似度阈值), 将  $c_{tn}$  加入到每个符合条件与之匹配的社团演化序列的最后。如果在处理完 1 个  $C_t$  后发现,  $Y_i$  中未见新的社团加入, 则表明序号为  $i$  社团演化序列停止演化, 属于死亡事件; 如果只有一个新社团加入  $Y_i$ , 则属于延续事件; 如果有不止一个新社团加入  $Y_i$ , 则表明该社团演化序列的演化产生了分支, 属于分裂事件; 如果存在数个社团演化序列中新加入的社团是同一社团的情况, 则表明这几个社团演化序列在该关键帧上演化为同一社团, 属于合并事件; 如果  $c_{tn}$  不能加入到任何一个存活的社团演化序列中, 则将  $c_{tn}$  作为一个新的社团演化序列(此时序列只有  $c_{tn}$  一个社团)加入到  $Y$  中, 这属于新生事件。

(c) 重复 (b) 中步骤, 直至遍历完所有时间序列上的社团。

## 2 结果

### 2.1 基于 Louvain 算法的社团检测结果的可靠性

Louvain 算法是基于模块度  $Q$  的社团检测算法, 而模块度  $Q$  又是衡量社区检测算法的重要指标。通常认为, 当  $Q$  大于 0.3 时, 社区检测算法的结果相对可靠,  $Q$  越接近 1, 算法检测性能越高<sup>[16]</sup>。通过时间序列上的关键帧网络的平均模块度  $Q$  (Table 1) 显示, 所有的平均模块度  $Q$  都大于 0.65, 这表明残基相互作用网络的社团划分结果是可靠的。

**Table 1 Modularity of the xylanase residue interaction network community**

Xylanase / Temperature	The modularity Q
Xyna_strli/300 K	0.679
Xyna_strli/400 K	0.690
Xyna_theau/300 K	0.691
Xyna_theau /400 K	0.699

本文通过 Gephi 软件对 xyna\_strli 在 300 K 温度下第 1 个关键帧的残基相互作用网络的社团检测结果进行了可视化( Fig.4)。Fig.4 中左侧表示的是原始的残基相互作用网络,右侧为经过 Louvain 算法进行社团检测后的残基相互作用网络,同一颜色的残基聚类到同一个社团中。通过社团检测,可以发现在空间上距离较近的残基存在紧密的相互作用,可见社团检测能够发现残基在空间的协同制约关系。

## 2.2 基于相邻时刻社团相似度比较的社团演化

利用相邻时刻社团相似度比较的方法分析

**Table 3 Some residues and their secondary structures in the stable communities**

Corresponding situation	Residues in the stable communities	The secondary structure of residues
The same residues in the stable communities of xyna_strli at 300 K and 400 K	ALA1 ,GLU2 ,SER3 ,THR4 ,GLY6 ,ALA7 ,ALA8 ,ALA9 ,ALA10 ,GLN11 ,SER12 ,GLY13 ,ARG14	$\alpha$ 0-loop
	LEU300 ,ASN301 ,GLY302	$\alpha$ 8
The unique residues in the stable communities of xyna_strli at 400 K	LEU5	$\alpha$ 0
	ARG36 ,GLU37	$\alpha$ 1
The same residues in the stable communities of xyna_theau at 300 K and 400 K	LEU238 ,ASP239 ,ILE240 ,ALA241 ,GLY242 ,ALA243	loop7
The unique residues in the stable communities of xyna_theau at 400 K	ALA270 ,ASP271 ,PRO272 ,ASP273 ,SER274 ,TRP275 ,ARG276	$\alpha$ 8''-loop
	ALA277 ,SER278 ,THR279 ,THR280 ,THR281 ,LEU282	$\alpha$ 8''-loop

构成稳定社团的残基以及它们之间的相互作用显示在 Fig.5 中。对于 xyna\_strli 在 300 K 时,稳定社团中的重要残基为 GLU2 ,ALA7 ,ALA8 ,ALA9 ,GLN11 ,LEU297 ,LEU300 和 ASN301。当温度升高为 400 K 时,重要残基为 ALA8 ,ALA9 和 ALA10。随着温度升高 N 端和 C 端的作用力减弱,但是 ALA8 和 LEU300 之间依然存在很稳定的作用。对于 xyna\_theau 在 300 K 时,稳定社团中的重要残基为 ILE240 ,ASP247 ,TYR248 ,ILE297。当温度升高后,重要残基为 ASP239 ,ALA241 ,ARG276 ,ALA277 ,THR279 和 PRO281。随着温度升高 N 端和 C 端的作用力减弱,但在 xyna\_theau 活性位点 GLU237 附近的残基 ASP239 和 ILE240 ,ASP240 和 ALA241 等依旧保持牢固连接。稳定社团在三维结

xyna\_strli 和 xyna\_theau 在 300 K 和 400 K 温度下的社团演化情况,并对稳定社团进行三维结构和残基相互作用力的分析,以发现其与木聚糖酶耐热性的关系。Table 2 为所发现的稳定社团的稳定程度和稳定社团的规模。从 Table 2 可以看出,无论是 xyna\_strli 还是 xyna\_theau,在 300 K 时稳定社团的稳定性非常高,存在于所有 21 个关键帧中,而随着温度升高,xyna\_theau 的稳定社团比 xyna\_strli 更稳定些。

**Table 2 Stable societies of xylanase at different temperatures**

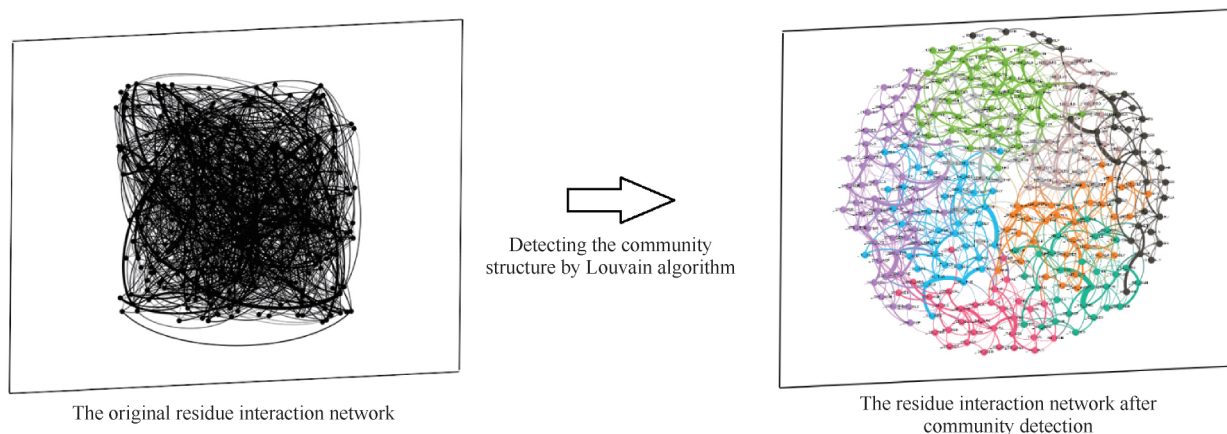
Xylanase/ Temperature	Degree of stability in a stable community ( Proportion)	Stable community size ( Nodes , edges)
Xyna_strli/300 K	100%	21 ,45
Xyna_strli/400 K	38%	19 ,27
Xyna_theau/300 K	100%	28 ,57
Xyna_theau/400 K	43%	19 ,36

构中的位置显示在 Fig.6 中,由 Fig.6 的结果发现,稳定社团大部分在残基上都包含了木聚糖酶的 N 端和 C 端,这种末端的稳定作用对于维持三维结构的稳定性非常重要。研究<sup>[17,18]</sup>表明,蛋白质末端在结构稳定性和功能中有着较大作用。Mahanta 等<sup>[5]</sup>发现了蛋白质末端与酶稳定性的关系,成功通过增加 N 端至 C 端的相互作用增强了酶的稳定性。末端区域的断裂可能使酶的折叠在高温下更不稳定。因此,如果末端区域相互作用保持稳定,从而有利于降低酶在高温下展开的敏感性<sup>[19]</sup>。所挖掘的稳定社团进一步证明了 N-C 端相互作用对木聚糖酶耐热性的影响作用。

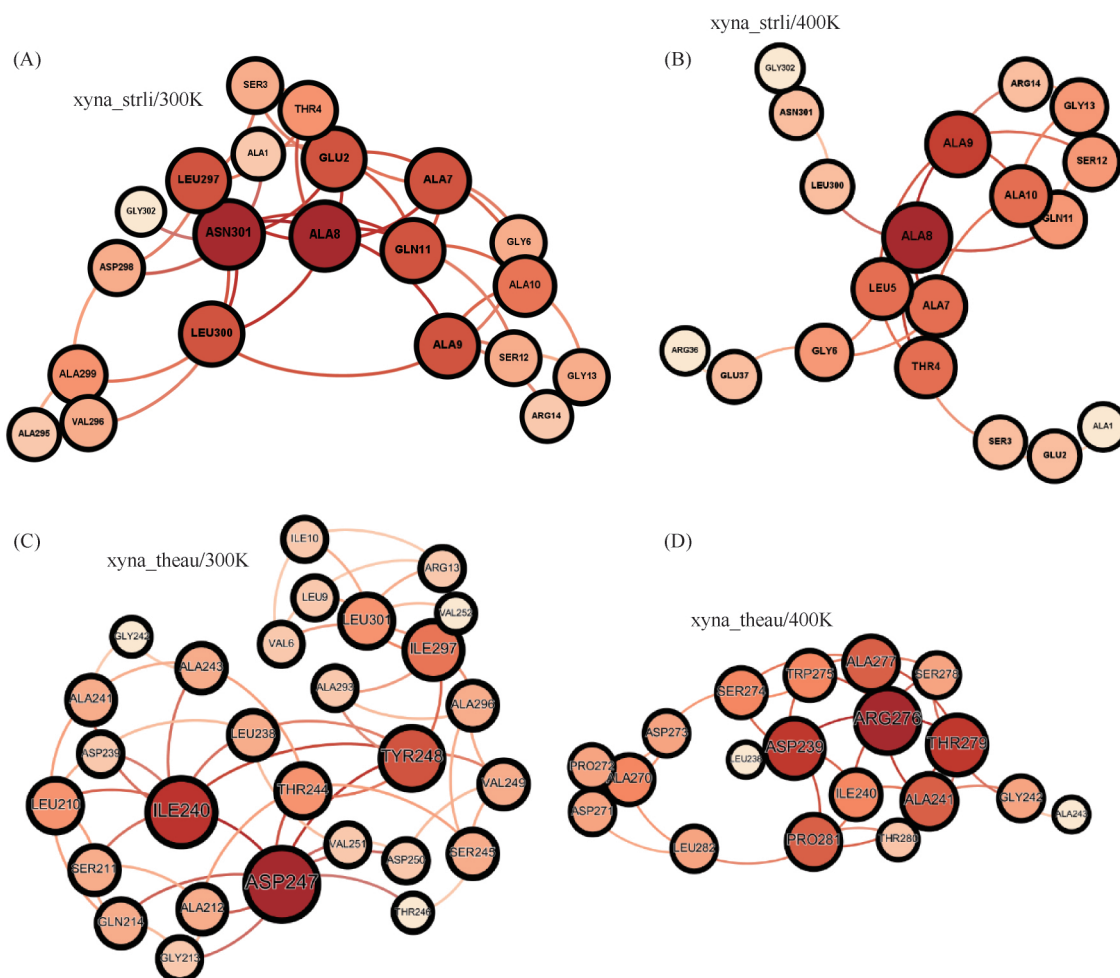
## 2.3 稳定社团中的二级结构

社团是由相互作用较为密切的残基组成的,社





**Fig.4 Organization of xyna\_strli residual interaction network in frame 1 at 300 K** The left side represents the original residue interaction network, and the right side represents the residue interaction network after community detection by Louvain algorithm. Residues of the same color are clustered into the same community

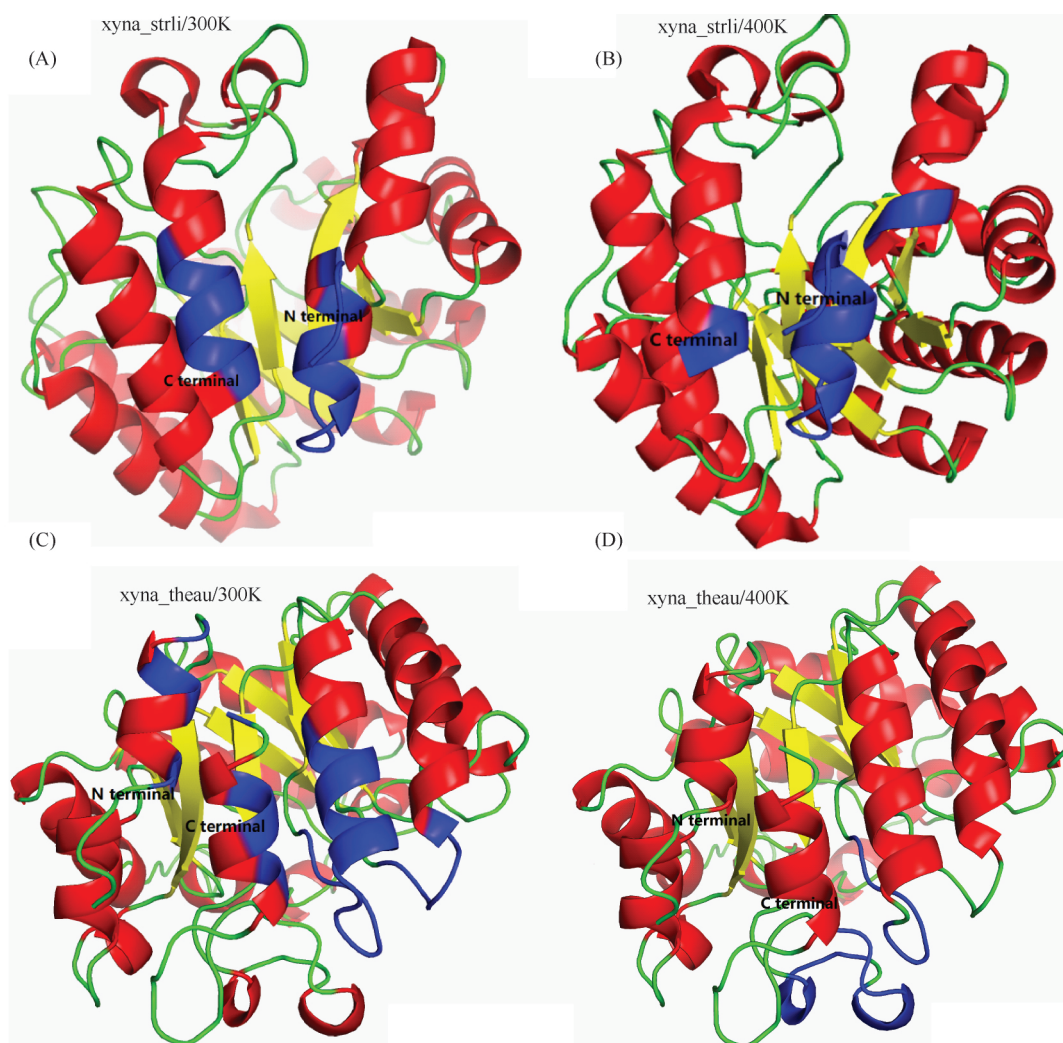


**Fig.5 Stable communities** The figure shows the stable community, in which the degree of residual node is represented by the size and color. The larger degree of a residual node, the larger size and the deeper the color of the node

团与木聚糖酶的稳定性之间有着重要的联系。稳定社区的存在说明二级结构之间存在协同作用。因此,二级结构之间残基的相互作用是影响木聚糖酶耐热性的关键因素<sup>[6,20]</sup>。可见分析稳定社区中的

二级结构之间的关系并分析维持二级结构之间的作用力是非常重要的。

总体来看,木聚糖酶在 300 K 和 400 K 温度下的稳定社区靠近蛋白质的末端。从 xyna\_strli 和

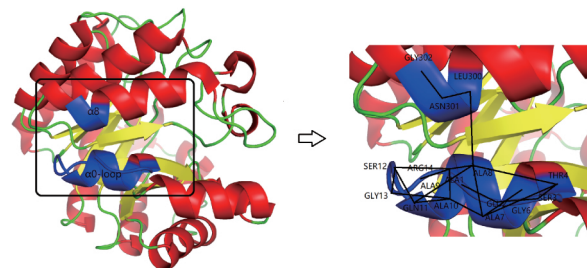


**Fig.6 The corresponding position of the stable community in the three-dimensional structure** The blue part is the stable community , the red part is the helix , the yellow part is the beta strand , and the green part is the loop region

xylna\_theau 中挖掘到的稳定社团是在演化过程中长时间存在的。这些集中在蛋白质末端的结构稳定地保持相互作用,提高了木聚糖酶的耐热性。

比较 xylna\_strli 在 300 K 和 400 K 温度下的稳定社团,两者存在较多相同的残基结构,这些残基所在的二级结构见 Table 3。随着温度升高,这些结构依旧保持相互作用,是具有一定稳定性的结构。通过将这些相同结构进行三维结构的可视化( Fig.7 ),发现在 xylna\_strli 的 C 端,LEU300 与 ASN301 以及 ASN301 与 GLY302 之间形成的稳定范德华相互作用,使得螺旋  $\alpha 8$  的 C 端趋于稳定。螺旋  $\alpha 8$  的 C 端又通过 ASN301 与 ALA8 之间稳定的范德华作用而连接,增强了螺旋  $\alpha 8$  和螺旋  $\alpha 0$  的联系。在螺旋  $\alpha 0$  中,ALA8、THR12、ALA11、GLY10、SER7 和 ALA4 明显充当了重要的“中心”残基的角色,它们与其他残基之间形成的范德华力、氢键使得螺旋  $\alpha 0$  难以解

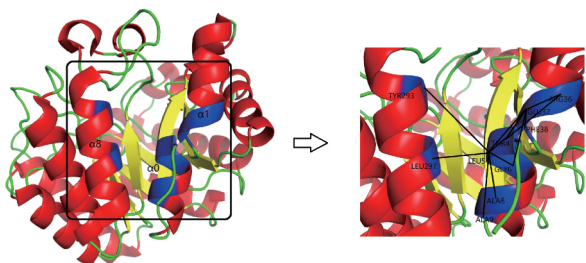
开,并保持了其连接的柔性区域的稳定性。这些结构都使得木聚糖酶的结构更加坚固,增强了 xylna\_strli 的稳定性。



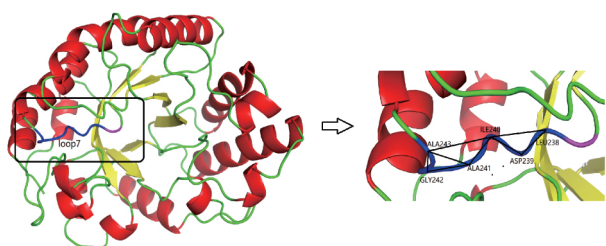
**Fig.7 The same structure in the stable community of xylna\_strli at 300 K/400 K** The blue part is the same structure in stable community , the black line represents the interaction between residues and the area in the black box is enlarged

xylna\_strli 在 300 K、400 K 温度下稳定社团的残

基结构也存在不同,这些不同的结构与木聚糖酶的耐热有关:相较 300 K 温度下,LEU5、ARG36、GLU37 是在 400 K 温度下稳定社团中独有的残基,这些残基所在的二级结构见 Table 3。本文将 400 K 温度下稳定社团中与这些独有残基存在相互作用的残基进行挖掘,其三维结构如 Fig.8 所示。观察发现,在蛋白质末端区域中,α8 中的 TYR293、LEU297 与 α0 中的 LEU5 形成氢键和范德华力,使得末端区域之间保持稳定连接,从而有利于降低木聚糖酶在高温下展开的敏感度。GLU37 和 LEU5 起到了“中心残基”的作用,不仅维持了螺旋 α0、α1 在空间中的稳定性,同时也增强了螺旋 α0、α1、α8 之间的联系,提高了木聚糖酶的耐热性。



**Fig.8** The secondary structure of the unique residues of *xyna\_strli* at 400 K The blue part is the secondary structure of the unique residues in stable community of *xyna\_strli* at 400 K

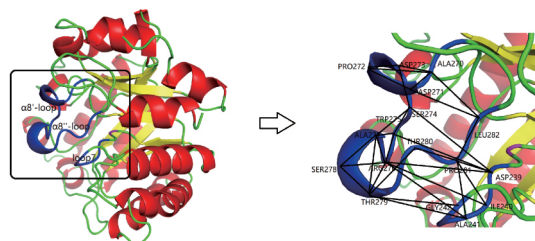


**Fig.9** The same structure in the stable community of *xyna\_theau* at 300 K/400 K The blue part is the same structure in the stable community, the purple part is the active site GLU237

*xyna\_theau* 在 300 K、400 K 温度下稳定社团中相同的残基以及所在的二级结构见 Table 3。通过将相同结构进行三维结构的可视化 (Fig.9),发现在 *xyna\_theau* 的柔性区域 loop7 上,ALA243 与 ALA241, ALA241 与 ILE240, ILE240 与 ASP239、LEU238 之间皆保持着稳定的连接。同时,这些残基都处在 *xyna\_theau* 的一个活性位点 GLU237 附近。邻近活性位点的环形(loop)结构增加了刚性,对酶的稳定性有着重要的影响,杜坤<sup>[21]</sup>在缩短酶

活性位点附近的环形结构后发现蛋白酶的活性提高,稳定性降低。这种通过降低环形区的柔性方法成功改造了酶的热稳定性和活性。在 *xyna\_theau* 的稳定社团中,ALA243、ILE241、ALA240 等残基之间形成的氢键相互作用,以及范德华力也增强了周围柔性环形区的稳定性,从而提高了 *xyna\_theau* 的稳定性。

*xyna\_theau* 稳定社团在 400 K 温度下独有的残基(独有残基所在的二级结构见 Table 3)以及与其存在相互作用的残基的三维结构显示在 Fig.10 中。研究表明<sup>[22]</sup>,短螺旋结构在稳定木聚糖酶中发挥关键作用,它可以通过缩短连接两端结构的环形区来增加木聚糖酶的热稳定性。不过短螺旋结构在高温下会变得不稳定,容易变成其他二级结构<sup>[23]</sup>。从挖掘得到的残基结构来看,短螺旋 α8'、α8''都和其两端连接的环形上的残基通过范德华力、氢键形成稳定的相互作用,像一个“钳夹”一样稳定了短螺旋 α8'、α8'',同时使得柔性区的鲁棒性得到提升,提升了木聚糖酶的热稳定性。同时,α8''-loop 结构上的残基又与 *xyna\_theau* 的活性位点 GLU237 附近的残基存在稳定连接:THR279 与 ALA241, ARG278 与 ALA241, PRO281 与 ILE240 和 ALA241 等。这些残基之间的稳定相互作用,增强了短螺旋 α8'-loop、α8''-loop、loop7 的相互作用,并使得柔性区域更加稳固,进而提升了木聚糖酶的热稳定性。



**Fig.10** The secondary structure of unique residues of *xyna\_theau* at 400 K The blue part is the secondary structure of the unique residues in the stable community of *xyna\_strli* at 400 K

### 3 讨论

本文使用 Louvain 算法对 *xyna\_strli* 和 *xyna\_theau* 的残基相互作用网络进行内部结构的挖掘,通过最大化模块度  $Q$  的方式将相互作用密切的残基归为一个社团。再通过社团相似度比较的方法,挖掘动态演化社团,并选取了演化时间最久的社团作为稳定社团。稳定社团对木聚糖酶的影响是持久、



具有一定强度且有代表性的,通过对稳定社团的具体分析,发现:总体上看,木聚糖酶的稳定社团靠近蛋白质的末端,N-端和C-端通过相互作用形成稳定的结构,降低了结构的柔性,提高了木聚糖酶的耐热性。通过对 xyna\_strli 在 300 K 和 400 K 温度下稳定社团中残基结构的比较,发现螺旋  $\alpha_8$  的 C-端与螺旋  $\alpha_0$  之间存在稳定连接,是具有稳定性的结构;在 xyna\_strli 中以 GLU237 和 LEU5 为“中心残基”的结构,不仅维持了螺旋  $\alpha_0$ 、 $\alpha_1$  在空间中的稳定性,同时也增强了螺旋  $\alpha_0$ 、 $\alpha_1$ 、 $\alpha_8$  之间的联系,提升了木聚糖酶的耐热性。在 xyna\_theau 中,残基 LEU238、ASP239、ILE240、ALA241、GLY242、ALA243 在活性位点 GLU237 附近的环形区域上形成了稳定连接,降低了环形区域的柔性,是具有稳定性的结构;短螺旋  $\alpha_8'$ 、 $\alpha_8''$  与它们相连环形结构上的残基通过范德华力、氢键相互作用,像一个“钳夹”一样稳定了  $\alpha_8'$ 、 $\alpha_8''$ ,增强柔性区的鲁棒性并提升了木聚糖酶的热稳定性。相较于 xyna\_strli,xyna\_theau 的稳定社团对不稳定的柔性环形区域的影响范围更大、作用更强,并且 xyna\_theau 对高温中不稳定的短螺旋结构  $\alpha_8'$ 、 $\alpha_8''$  有着稳固作用。xyna\_theau 稳定社团中的靠近活性位点 GLU237 的残基,增强了木聚糖酶的稳定性的提升是 xyna\_theau 耐热性优于 xyna\_strli 的原因。

## 参考文献(References)

- [1] Dien LQ, Hoang PH, Tu DT. Application of enzyme for improvement of acacia APMP pulping and refining of mixed pulp for printing papermaking in Vietnam [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, **172**(3): 1565-1573
- [2] Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2001, **56**(3-4): 326-338
- [3] de Souza AR, de Araújo GC, Zanphorlin LM, et al. Engineering increased thermostability in the GH-10 endo-1, 4- $\beta$ -xylanase from *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 [J]. Int J Biol Macromol, 2016, **93**(Pt A): 20-26
- [4] Ping L, Wang M, Yuan X, et al. Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus* [J]. Int J Biol Macromol, 2018, **109**: 1270-1279
- [5] Mahanta P, Bhardwaj A, Kumar K, et al. Structural insights into N-terminal to C-terminal interactions and implications for thermostability of a ( $\beta/a$ ) 8-triosephosphate isomerase barrel enzyme [J]. FEBS J, 2015, **282**(18): 3543-3555
- [6] Zheng F, Huang J, Liu X, et al. N- and C-terminal truncations of a GH10 xylanase significantly increase its activity and thermostability but decrease its SDS resistance [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2016, **100**(8): 3555-3565
- [7] Irfan M, Gonzalez CF, Raza S, et al. Improvement in thermostability of xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* C5 by site directed mutagenesis [J]. Enzyme Microb Technol, 2018, **111**: 38-47
- [8] 陶斯涵, 丁彦蕊. 基于残基相互作用网络比对的木聚糖酶热稳定性研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Tao SH, Ding YR. Research on the Xylanase Thermostability Based on Residue Interaction Network Alignment [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2018, **34**(7): 760-768
- [9] Sun W. The relationship between low-frequency motions and community structure of residue network in protein molecules [J]. J Comput Biol, 2018, **25**(1): 103-113
- [10] Verkhivker GM. Dynamics-based community analysis and perturbation response scanning of allosteric interaction networks in the TRAP1 chaperone structures dissect molecular linkage between conformational asymmetry and sequential ATP hydrolysis [J]. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 2018, **1866**(8): 899-912
- [11] Stetz G, Verkhivker GM. Probing allosteric inhibition mechanisms of the Hsp70 chaperone proteins using molecular dynamics simulations and analysis of the residue interaction networks [J]. J Chem Inf Model, 2016, **56**(8): 1490-1517
- [12] Stetz G, Verkhivker GM. Computational analysis of residue interaction networks and coevolutionary relationships in the Hsp70 chaperones: A community-hopping model of allosteric regulation and communication [J]. PLoS Comput Biol, 2017, **13**(1): e1005299
- [13] Yang C, Ji J, Lv J. Identifying protein complexes method based on time-sequenced association and ant colony clustering in dynamic PPI networks [C]. 2016 IEEE 16th Int Conf on BIBE. Taiwan: IEEE, 2016: 21-27
- [14] Zhang C, Ding Y. Probing the Relation between Community Evolution in Dynamic Residue Interaction Networks and Xylanase Thermostability [J]. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinf, 2019. doi: 10.1109/TCBB.2019.2922906
- [15] Greene D, Doyle D, Cunningham P. Tracking the Evolution of Communities in Dynamic Social Networks [C]. 2010 Int Conf on Adv in Social Netw Anal and Mining, Denmark: IEEE, 2010: 176-183
- [16] Clauset A, Newman MEJ, Moore C. Finding community structure in very large networks [J]. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2004, **70**(6Pt2): 066111
- [17] Merz A, Knochel T, Jansonius JN, et al. The hyperthermostable indoleglycerol phosphate synthase from *Thermotoga maritima* is destabilized by mutational disruption of two solvent-exposed salt bridges [J]. J Mol Biol, 1999, **288**(4): 753-763
- [18] Song L, Tsang A, Sylvestre M. Engineering a thermostable fungal GH10 xylanase, importance of N-terminal amino acids [J]. Biotechnol Bioeng, 2015, **112**(6): 1081-1091
- [19] Krishna MMG, Englander SW. The N-terminal to C-terminal motif in protein folding and function [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, **102**(4): 1053-1058
- [20] Chen CC, Luo H, Han X, et al. Structural perspectives of an engineered  $\beta$ -1, 4-xylanase with enhanced thermostability [J]. J Biotechnol, 2014, **189**: 175-182
- [21] 杜坤. 活性位点邻近的  $\Omega$ -loop 对胰蛋白酶热稳定性和活性的影响 [D]. 天津: 天津大学 (Du K. Active site adjacent  $\Omega$ -loop's influence on the thermal stability and trypsin activity [D]. Tianjin: Tianjin University), 2017
- [22] Natesh R, Bhanumoorthy P, Vithayathil PJ, et al. Crystal structure at 1.8 Å resolution and proposed amino acid sequence of a thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus* [J]. J Mol Biol, 1999, **288**(5): 999-1012
- [23] Jeong MY, Kim S, Yun CW, et al. Engineering a de novo internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236 [J]. J Biotechnol, 2007, **127**(2): 300-309