郭铭菲, 郑煜铭, 顾海洋, 等. GH42 家族 β-半乳糖苷酶结构生物信息分析 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(10): 175−184. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040365

GUO Mingfei, ZHENG Yuming, GU Haiyang, et al. Structural Bioinformatics Analysis of GH42 Family β-Galactosidases[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(10): 175−184. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040365

· 生物工程 ·

GH42 家族 β-半乳糖苷酶结构生物信息分析

郭铭菲[1], 郑煜铭[2], 顾海洋[1], 王禄山[3], 董艺凝[1,*]

（1.滁州学院生物与食品工程学院, 安徽滁州 239000;
2.安徽大学生命科学学院, 安徽合肥 230000;
3.山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东青岛 266237）

摘　要: 目的：为解析 GH42 家族 (Glycoside hydrolase family 42）β-半乳糖苷酶不同嗜极催化特性差异形成的分子结构原因，本研究以 GH42 家族已解析晶体结构为研究对象，系统分析其结构特征与催化性质之间的关系。方法：通过酶催化特性与其来源微生物相关性，并结合氨基酸组成、进化、疏水性及结构生物信息分析方法，对具有不同嗜极催化特性 GH42 家族 β-半乳糖苷酶分子结构差异进行比较研究。结果：GH42 家族 β-半乳糖苷酶氨基酸组成具有偏好性，谷氨酸（E）含量高而赖氨酸（K）含量低，等电点（Isoelectric point，pI）偏低；酶的催化特性与其宿主微生物生长环境呈适应性关联。家族中耐热及耐低温酶存在“成对”进化现象。耐热酶分子结构内部疏水性高，而耐低温酶表面亲水性强。耐低温酶在 TIM（Triose-phosphate isomerase，TIM）桶状催化结构域与 Domain B 链接处以及 C-末端存在共性柔性差异显著区域；而耐热酶则通过提高氢键数量及氨基酸 P 含量增强单体刚性提高作用温度。结论：GH42 家族以保守分子结构为基础，通过分子内部与外部疏水性差异分化出耐低温及耐热两类 β-半乳糖苷酶。家族酶对温度的适应性是其单体分子结构柔性、氢键数量及聚合态共同作用的结果。本研究从家族进化关系出发，系统探讨了成员酶之间的结构差异及其催化特性分化，为 GH42 家族 β-半乳糖苷酶嗜极性催化特性的深入研究及具有多元耐受特性工程酶的开发提供了通用性参考。

关键词: 糖苷水解酶 42 家族（GH42）, β-半乳糖苷酶, 结构生物信息, 进化, 嗜极催化特性
中图分类号: Q556+.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)10−0175−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040365
本文网刊:

Structural Bioinformatics Analysis of GH42 Family β-Galactosidases

GUO Mingfei[1], ZHENG Yuming[2], GU Haiyang[1], WANG Lushan[3], DONG Yining[1,*]

（1.School of Biological Science and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China;
2.School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230000, China;
3.State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Qingdao 266237, China）

Abstract: Objective: To elucidate the structural basis underlying the diverse extremophilic catalytic properties of β-galactosidases in the GH42 glycoside hydrolase family, enzymes with resolved crystal structures were systematically analyzed to reveal the relationship between structural features and catalytic characteristics. Methods: Correlation analysis between catalytic properties and microbial habitats was performed, combined with amino acid composition, phylogenetic evolution, hydrophobicity distribution, and structural bioinformatics approaches, to investigate the structural determinants responsible for catalytic diversity among GH42 β-galactosidases. Results: GH42 β-galactosidases exhibited a biased amino acid composition characterized by relatively high glutamate (E) content and low lysine (K) content, resulting in generally low isoelectric points (pI). The catalytic properties of these enzymes were adaptively correlated with the growth

收稿日期: 2025−04−30
基金项目: 国家自然科学基金（31301523）; 微生物技术国家重点实验室开放课题基金（M2023-14）; 安徽省教育厅重点研究项目（KJ2021A1071, 2023AH051612）; 滁州市科技计划项目（2024YF003）; 滁州学院科研项目（2022XJZD20, 202022XJZD23）。
作者简介: 郭铭菲（2001−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶工程, E-mail: 13526566335@163.com。
*** 通信作者:** 董艺凝（1980−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程, E-mail: dong_yining@163.com。

environments of their host microorganisms. A "paired" evolutionary pattern was observed between thermophilic and cold-adapted β-galactosidases within the family. Thermostable enzymes possessed higher internal hydrophobicity, whereas cold-adapted enzymes display stronger surface hydrophilicity. Cold-adapted enzymes exhibited significantly distinct flexible regions at the junction between the TIM-barrel domain and Domain B, as well as at the C-terminus. In contrast, thermostable enzymes enhanced structural rigidity by increasing hydrogen bond numbers and proline (P) content to improve their optimal temperature range. Conclusion: GH42 β-galactosidases shared a conserved molecular scaffold and diverged into cold-adapted and thermostable enzymes via differential internal and surface hydrophobicity. Temperature adaptation of these enzymes arised from the synergistic effects of monomer flexibility, number of hydrogen bonds, and oligomeric state. Based on the evolutionary relationships within the family, this study systematically explored the structural divergence and catalytic differentiation among GH42 enzymes. These findings provide a general reference for further investigations into extremophilic catalysis of GH42 β-galactosidases and the development of engineered enzymes with multi-tolerant properties.

Key words: glycoside hydrolase family 42 (GH42); β-galactosidase; structural bioinformatics; evolution; polarophilic

β-半乳糖苷酶, 全称为 β-D-半乳糖苷半乳糖水解酶(β-D-galactoside galacto hydrolase, EC 3.2.1.23)具有强水解和弱转糖苷双向催化功能[1]。工业上以乳糖作为底物, 利用 β-半乳糖苷酶的转糖苷催化活性合成低聚半乳糖(galactooligosaccharide, GOS)[2]。按照氨基酸序列相似性, β-半乳糖苷酶分属于 GH1、GH2、GH35、GH42、GH50、GH59 家族, 并于 2024 年新增了 GH154 家族[3]。1994 年 GH2 家族首个 β-半乳糖苷酶晶体结构(PDB:4V40)被报道。1996 年, GH1 家族中报道了具有半乳糖苷水解活性的多功能糖苷酶(PDB:1GOW)。截至目前, GH1 和 GH2 两个家族中晶体结构总量明显多于其它五个家族, 但其中 β-半乳糖苷酶晶体结构数量并不多, 研究相对缓慢; GH50 和 GH59 家族中尚无 β-半乳糖苷酶晶体结构发布。而 GH42 和 GH35 家族来源 β-半乳糖苷酶因具有多样化催化特性及应用开发潜力, 越来越受到关注, 结构研究发展也相对较快, 近二十年持续有新的酶晶体结构研究[4−5]。

目前, 仅 GH42 家族为全部由 β-半乳糖苷酶组成的单一功能糖苷水解酶家族, 其家族成员作用底物偏好低聚糖类, 具有转糖苷催化合成益生元的应用开发潜力, 并包含耐热、耐低温、耐盐、耐碱等多样化嗜极催化特性[6−9]。系统研究这些具有进化关系, 且分子结构保守的同源酶之间结构差异与功能分化之间的关系, 对于 β-半乳糖苷酶的应用开发和分子改造具有积极促进作用。因此, 本研究以 GH42 家族 β-半乳糖苷酶晶体结构为研究对象, 通过结构生物信息分析, 初步探讨了酶的结构差异及其对温度适应性的影响, 为 GH42 家族 β-半乳糖苷酶催化特性研究及多元耐受特性工程酶的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

数据来源于 Carbohydrate-Active Enzymes (CAZY, http://www.cazy.org/)数据库中 GH42 家族已发布 β-半乳糖苷酶晶体结构, 包括 *Thermus* sp. A4 来源 A4-β-Gal(PDB ID: 1KWG、1KWK)、*Geobacillus stearothermophilus* T-6 来源 GanB 和 Gan42B (PDB ID: 4OIF、4OJY 和 5DFA)、*Halorubrum lacusprofundi* 来源 Bga (PDB ID: 6LVW)、*Marinomonas* ef1 来源 M-bGal(PDB ID: 6Y2K)、*Rahnella* sp. R3 来源 R-β-Gal(PDB ID: 5E9A)、*Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus* 来源 Bcα-β-Gal(PDB ID: 3TTS、3TTY)、*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bl-04 来源 Gal42A (PDB ID: 4UNI、4UOQ 和 4UOZ)、*Bifidobacterium bifidum* S17 来源 BbgII (PDB ID: 4UCF、4UZS)、*B. animalis* subsp. *lactis* Bl-04 来源 BlArap42B (PDB ID: 5XB7)、*Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* 来源 BiBga42A(PDB ID: 8IBR、8IBS 和 8IBT)。

1.2 实验方法

1.2.1 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶结构分析 利用 Discovery Studio 2021 对 β-半乳糖苷酶三维结构进行比对, 计算 RMSD 和序列相似度, 并进行分子结构图形可视化处理。使用 Composition Profiler(http://www.cprofiler.org)分析 GH42 家族, GH2 家族, GH35 家族及 Swissport51 结构数据之间氨基酸组成差异[10]。利用 BANΔIT(https://bandit.uni-mainz.de/)进行 PDB 结构 B'-factor 值计算及结构柔性比较[11]。

1.2.2 进化分析 利用 MEGA 软件及 TimeTree (http://www.timetree.org/)进行进化分析。

1.2.3 β-半乳糖苷酶理化性质分析 将蛋白序列按.fasta 文件格式或 UniProtKB 数据库编号输入 ExPASy ProtParam Tool(https://web.expasy.org/protparam/), 通过蛋白序列计算得出氨基酸组成比例、理论等电点(pI)、分子量(MW)及总疏水性(GRAVY)等。通过 ChimeraX软件加载酶分子结构文件(.pdb)利用"hbonds"命令计算分子内氢键数量(Intra-model H-bonds); 调整分子显示模式后生成表面(Surface)并计算表面电荷、亲水性。

1.3 数据处理

原始蛋白质序列数据通过 UniProt 数据库和

CAZY 数据库获取，序列分析与理化性质计算采用 ProtParamTool（ExPASy）。蛋白质结构分析在 UCSF ChimeraX（version 1.6.1）中进行。使用 Discovery Studio 2021 和 PyMOL 2.5 进行分子结构可视化处理。采用 Origin 2021 软件进行数据处理及图形绘制。

2　结果与分析

2.1　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶催化特性与其来源微生物相关性分析

GH42 家族现有 β-半乳糖苷酶晶体结构 12 个，除去 *Planococcus* sp. L4 来源 BgaP 为低分辨率结晶体外，本研究以其余 11 个晶体结构作为家族成员酶代表进行分析，并以 PDB ID 作为本研究过程中酶代号。由表 1 可知，GH1、GH2、GH35 和 GH42 家族中 β-半乳糖苷酶均采用了 TIM 催化结构，但不同家族来源酶在单体序列长度、结构与组成及聚合形式上都有差异。GH42 家族 β-半乳糖苷酶单体序列长度为 600~700 aa，大于 GH1 家族 β-半乳糖苷酶序列长度，且略小于 GH2 和 GH35 家族。虽然目前已知 β-半乳糖苷酶聚合态存在单体、二聚体、三聚体、四聚体、六聚体、八聚体和十二聚体七种形式，但 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶主要以较稳定的三聚体形式存在。这可能是由于这些 β-半乳糖苷酶多来源于嗜极性微生物，需要更稳定的聚合态形式以适应催化环境，如嗜热菌 *Thermus* sp. A4 和 *G. stearothermophilus* T-6，嗜冷菌 *Marinomonas* ef1 和 *Rahnella* sp. R3，嗜冷兼嗜盐菌 *H. lacusprofundi* 和 *Planococcus* sp. L4，嗜碱菌 *B. circulans* sp. *alkalophilus*。

同时，如表 2 所示，这些 β-半乳糖苷酶的催化特性也与其来源微生物生存环境相适应。如嗜热菌 *Thermus* sp. A4 来源 β-半乳糖苷酶 1KWG 最适作用温度为 70 ℃；嗜冷嗜盐菌 *H. lacusprofundi* 来源 β-半乳糖苷酶 6LVW 在低温条件（4~10 ℃）下仍然有活性。另外，GH42 家族多为中性 β-半乳糖苷酶，最适作用 pH 为 6.5，而嗜碱菌 *B. circulans* sp. *alkalophilus* 来源 β-半乳糖苷酶 3TTS 的 pH 作用范围可达 6~7.5；肠道益生菌属 *Bifidobacterium* 来源 β-半乳糖苷酶 4UNI、4UCF、5XB7 及 8IBR 作用温度范围为 30~45 ℃，最适作用 pH 为 5.5~6.5，适合肠道环境。由于乳糖不是嗜极微生物及肠道微生物进化过程中的常用及主要碳水化合物，因此与目前用于乳糖水解的商品化 β-半乳糖苷酶不同，GH42 家族 β-半乳糖苷酶多不擅长利用乳糖，对乳糖亲和力较弱。如表 2 所示，部分 GH42 家族成员酶甚至没有乳糖水解活性，包括 1KWG、4OIF 和 3TTS（3TTY）。但是，GH42 家族部分成员酶具有低聚糖大分子利用能力及转糖苷活性。如 3TTS 具有转糖苷活性；4OIF 能够利用低聚半乳糖；8IBR 能够利用乳四糖（LNT）。已有研究显示，GH42 家族可以利用与其基因组比邻的 GH53 家族先行降解的低聚糖分子[39]。由此表明，β-半乳糖苷酶催化特性与其来源微生物生存环境及其碳水化合物利用形式紧密相关，并且可能是造成 β-半乳糖苷酶催化特性差异产生的重要因素。

GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶氨基酸序列相似性差异较大。以 *Thermus* sp. A4 来源 1KWG 为参照，其它成员酶与其序列相似性一致性均为 30% 左右，但 Cα 原子 RMSD 值差异均小于 2，最低为 0.96，表明酶分子结构进化保守性较高。值得关注的是，耐热酶 1KWK 与同为耐热酶的 4OIF 氨基酸序列相似性最低、RMSD 值最大，反而与耐低温 β-半乳糖苷酶 6Y2K 氨基酸序列相似度最高，RMSD 值最小。由此推测 6Y2K 可能与 1KWK 在进化时间上更接近。同时也表明，除了对环境温度的适应性，造成催化功能进化分歧产生因素还有多种，如 GH42 家族肠道微生物来源的多个 β-半乳糖苷酶之间就具有对底物识别的差异性分化，这也与肠道复杂的碳水化合物存在环境相符合。

2.2　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶氨基酸组成分析

对比不同糖苷水解酶家族 β-半乳糖苷酶氨基酸组成可以发现，GH42 家族和 GH35 家族具有较明显的高含量区（蓝色）和低含量区（红色），而 GH2 家族氨基酸组成在含量上无明显分化（图 1）。GH42 家族

表 1　β-半乳糖苷酶在不同糖苷水解酶家族中的分布及结构差异

Table 1　Distribution and structural differences of β-galactosidase in glycoside hydrolase families

家族	β-半乳糖苷酶晶体结构数量/家族总晶体数量	单体序列长度	催化结构域	单体中Domain数量	聚合体形式	首个β-半乳糖苷酶晶体结构及发布时间
GH1	8/88	400~600 aa	TIM	–	二聚体[12]/四聚体[13−14]	1GOW（1996.9）
GH2	13/64	700~1000 aa	TIM	5	单体[15−17]/二聚体[18]/三聚体/四聚体[19−20]/六聚体[21]/八聚体[22]	4V40（1994.4）
GH35	13/18	600~1000 aa	TIM	6	单体[23−27]/二聚体[28−29]/四聚体[30−31]/十二聚体[32]	1TG7（2004.5）
GH42	10/12	600~700 aa	TIM	3	三聚体[5−6,9,33−37]/六聚体[38]	1KWG, 1KWK（2002.1）
GH50	0/4	–	–	–	–	–
GH59	0/1	–	–	–	–	–
GH154	1/2	398 aa	$(\alpha/\alpha)_6$	–	四聚体[3]	8OI4（2024.1）

注：“–”表示尚无数据报道。

表 2 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶特性

Table 2 Main characteristics of known 3D structure GH 42 β-galactosidases

来源微生物特点	来源微生物（酶代号）	PDB ID	催化氨基酸位点	序列相似性(%)	Cα RMSD（Å）	催化特性
嗜热	*Thermus* sp. A4(A4-β-Gal)	1KWG 1KWK	E141 E312	100	0.00	三聚体; T_{opt}70 ℃, pH6.5; 对乳糖亲和力弱。
	G. stearothermophilus T-6（GanB;Gan42B）	4OIF 4OJY 5DFA	E158 E323	26.3	1.98	三聚体; T_{opt} 53 ℃, pH6.0; 无乳糖活性; 无转糖苷活性; 对GOS有催化活性。
嗜冷、嗜盐(来自南极冰湖)	*H. lacusprofundi*（Bga）	6LVW	E142 E312	45.4	1.44	三聚体; 4 mol/L NaCl 或 KCl存在条件下, T_{opt} 50~55 ℃, pH6.5; 4~10 ℃下可保留10%~13%活性。
嗜冷（来自南极）	*Marinomonas* ef1（M-bgal）	6Y2K	E142 E314	54.0	0.96	六聚体; T_{opt} 5 ℃, 37~50 ℃稳定; pH6.0。
嗜冷	*Rahnella* sp. R3（R-β-Gal）	5E9A	E157 E314	30.6	1.90	三聚体; 4 ℃活性高; 作用温度4~35 ℃, pH6.5。
嗜碱	*B. circulans* sp. *alkalophilus*（Bcα-β-Gal）	3TTS 3TTY	E150 E307	29.2	1.75	六聚体; T_{opt} 55 ℃, 最适作用pH6~7.5; 对乳糖亲和力低, 具有弱转糖苷活性。
肠道益生菌	*B. animalis* subsp. *Lactis*（Gal42A）	4UNI 4UOQ 4UOZ	E159 E323	27.3	1.86	三聚体; T_{opt} 45 ℃, pH5.5。
	B. bifidum S17(BbgII)	4UCF 4UZS	E161 E320	26.9	1.89	三聚体; T_{opt} 40 ℃, pH6.0; 无GOS合成能力。
	B. animalis subsp. *lactis* Bl-04（BlArap42B）	5XB7	E151 E311	25.7	1.91	三聚体; T_{opt} 30 ℃, pH6.5。
	B. longum subsp. *infantis*（BiBga42A）	8IBR 8IBS 8IBT	E160 E318	29.5	1.85	三聚体; T_{opt} 37 ℃, pH6.5; LNT利用能力。

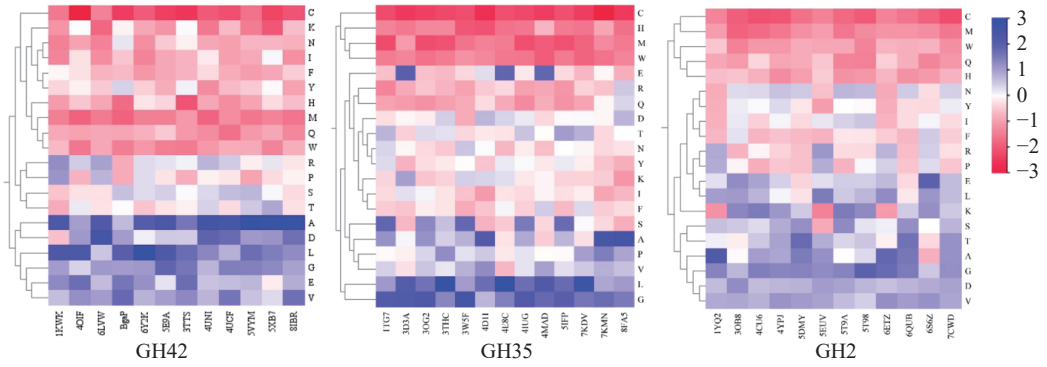


图 1 GH42、GH35 及 GH2 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶氨基酸组成对比

Fig.1 Comparison of the amino acid composition of the known crystal structures β-galactosidase of GH42, GH35 and GH2 families

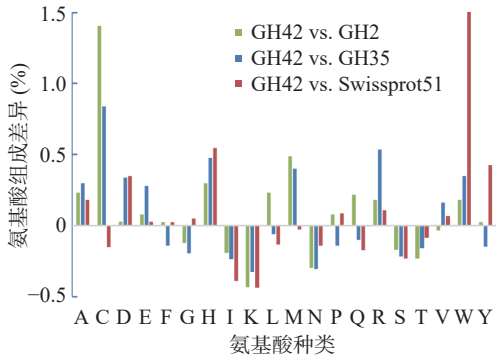


图 2 GH42 家族与 GH2、GH35 和 SWISS-PROT 数据库氨基酸含量分布差异比较

Fig.2 Amino acid distribution of GH42 relative to GH2, GH35 and SWISS-PROT database

与 GH2、GH35 家族和蛋白结构数据库(Swissprot51)相比(图 2), 含量上调氨基酸为 A、D、E、H、R 和 W; 含量下调氨基酸为 I、K、N、S 和 T。表明 GH42 家族 β-半乳糖苷酶氨基酸组成具有偏好性。另外, 带短侧链的脂肪族氨基酸 A 和 G 在三个家族中含量均较高; 氨基酸 C 和 M 在三个家族中普遍较低。而与 GH2 家族和 GH35 家族相比, GH42 家族中酸性、带负电荷的氨基酸 E 含量高,而带正电荷的碱性氨基酸 K 含量低。同时, GH42 家族 β-半乳糖苷酶 pI 相对低于其它两个家族, 其中 GH42 家族平均 pI 为 5.41, GH35 家族平均 pI 为 5.95, 而 GH2 家族平均 pI 为 5.80。有研究表明, 蛋白质进化过程中可以通过氨基酸替换促使 pI 发生改变[40]。由此推测, GH42家族 E 含量高、K 含量低的特点可能是其 pI 值相对其它家族较低的原因。另有关于嗜极性酶分子进化的研究结果显示, 低 pI 值、酸性酶蛋白更适应高盐环境[41]。GH42 家族具有多种来源于嗜极性细菌和古细菌的 β-半乳糖苷酶, 对早期地球环境的进化适应可能是形成这一氨基酸组成特点的

原因。

另外，GH42 家族 β-半乳糖苷酶中氨基酸 T、S、P 和 R 含量差异较大。其中，P 含量较高的 1KWK、6LVW 和 6Y2K 均具有较好的热稳定性。如，1KWK 为耐热酶；6LVW 兼具热稳定性及耐低温催化特性；耐低温的 6Y2K 与 6LVW 相似，均具有良好的热稳定性(37~50 ℃)。现有研究结果表明 P 含量高，可增强酶分子结构刚性[42]。但是，同为耐热酶的 4OIF 中出现例外，其 P 含量较低。由此表明，P 含量不是决定 GH42 家族 β-半乳糖苷酶分子结构热稳定性的唯一因素。

2.3　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶进化分析

对 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶的进化分析结果如图 3 所示。与预期假设不同，进化并未按照酶来源微生物对环境的适应性进行聚类。相反地，*Marinomonas* ef1 来源耐低温酶 6Y2K 与 *Thermus* sp. A4 来源耐热酶 1KWG，以及 *Rahnella* sp. R3 来源耐低温酶 5E9A 与 *G. stearothermophilus* T-6 来源耐热酶 4OIF，分别表现出较近的进化关系。有研究表明，酶的嗜冷与嗜盐功能进化存在结构上的矛盾性，多数低温海水环境(即耐盐耐低温环境)中的微生物来源酶往往具有中温适应性[43]。还有研究认为，耐低温特性需要通过损失热稳定性来获取[44]。这也可能是 GH42 家族耐热与耐低温 β-半乳糖苷酶进化上相近的原因。基于耐低温酶与耐热酶在不同时期、“成对”进化现象，结合这两类酶分子 Cα 骨架具有较高的保守性，本研究推测，GH42 家族耐低温及耐热 β-半乳糖苷酶可能是基于相对保守的分子结构，通过氨基酸突变分化出与其来源微生物生长环境温度相适应的稳定性和作用温度范围。有关 GH42 家族 β-半乳糖苷酶对环境温度的适应性进化机制还有待深入探讨。

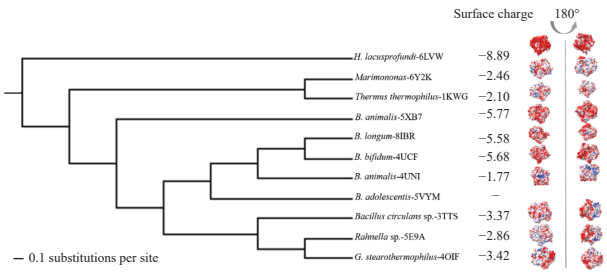


图 3　GH42 家族嗜极性微生物来源 β-半乳糖苷酶表面电荷及进化分析

Fig.3　Surface charge and evolutionary analysis of β-galactosidase derived from polarophilic microorganisms of GH42 family

此外，现有研究认为蛋白质表面非保守氨基酸是其在相对拥挤细胞环境中相互“碰撞”产生的进化结果，表面电荷是影响酶蛋白对盐耐受性的重要因素[41,45]。本研究观察并分析了 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶进化过程中表面电荷的变化情况，发现处于进化早期的 *H. lacusprofundi* 来源 6LVW，表面电荷明显低于进化后期家族成员。有研究表明，蛋白质表面电荷影响其在细胞中与其它蛋白质的相互作用，并且在不同宿主细胞中存在较大差异。而嗜极性微生物来源的酶蛋白表面电荷往往变异较大，以更好地适应其所在的细胞环境[46−47]。由此推测，6LVW 表面电荷明显较低可能正是对其所处细胞环境的一种适应性表现。同时，另有研究显示，微生物种群能够根据其内含蛋白质的表面电荷进行聚类，同类微生物其内含蛋白质具有相近的表面电荷，但是同一微生物种属间也存在进化差异[48]。GH42 家族 β-半乳糖苷酶表面电荷符合上述规律，如 *Bifidobacterium* 来源 β-半乳糖苷酶 5XB7、8IBR 和 4UCF 表面电荷都为−5 左右，但 *B. animalis* subsp. *Lactis* Bl-04 来源 4UNI 为−1.77，在研究对象中表面电荷最高，也是研究对象中已知唯一的弱耐酸性酶。由此表明，蛋白质结构表面带电氨基酸突变也是 GH42 家族 β-半乳糖苷酶获得相应细胞环境适应性的进化途径。

2.4　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶疏水性特性（RGAVY）分析

如图 4 所示，对比耐热酶与耐低温发现，二者 GRAVY 没有规律性差异，但耐低温酶分子结构表面 GRAVY 值（Surface-GRAVY）和内部 GRAVY 值(以 TIM 桶状结构域 8 个 β-片层计，β_8-GRAVY)均低于耐热酶。符合耐低温酶表面亲水性较强，耐热酶内部疏水性较强的规律[49−52]。由此推测，GH42 家族 β-半乳糖苷酶最适作用温度与 Surface-GRAVY 值及 β_8-GRAVY值相关。进一步分析发现，在序列相似度较高的情况下，内部 β_8 结构域疏水性高，分子表面亲水性高的酶最适作用温度高，如 4UNI(T_{opt} 45 ℃)与 4UCF(T_{opt} 40 ℃)；具有相似 β_8-GRAVY 值，Surface-GRAVY 值的酶最适作用温度相近。例如，来自嗜碱性微生物的 3TTS 与耐热酶 4OIF，二者序列相似度高，β_8-GRAVY 值及 Surface-GRAVY 值均接近，即内部疏水性及表面亲水性相似，则二者最适作用温度亦相似，分别是 53和 55 ℃。GH42 家族相对其它含 β-半乳糖苷酶的糖苷水解酶家族，具有

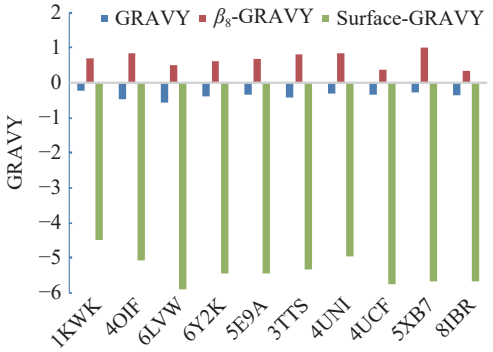


图 4　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶 GRAVY 值

Fig.4　GRAVY value of known crystal stuctures β-galactosidases in GH42 family

典型的 TIM 桶状结构域，这可能是部分序列相似度高、分子结构 RMSD 差异小的家族成员最适作用温度与 Surface-GRAVY 值和 β_8-GRAVY 值相关的原因。

2.5　GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶结构差异分析

GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶分子结构之间差异相对较小，RMSD 值均在 1.5 左右。但其对温度的适应性却呈现出耐高温、耐低温及兼具耐低温和热稳定性的多元化特性。已有研究表明，耐热酶分子具有较高的刚性，而耐低温酶分子结构柔性较大[53−55]。因此，本研究以表征分子结构柔性的 B-factor 为主要指标，通过对比归一化 B-factor（即 B'-factor）分析结构差异产生的空间位置及与温度适应性之间的关系。

2.5.1　嗜冷微生物来源 β-半乳糖苷酶分子结构对比

6LVW、6Y2K 和 5E9A 同为 GH42 家族嗜冷微生物（*H. lacusprofundi*、*Marinomonas* ef1、*Rahnella* sp. R3）来源 β-半乳糖苷酶，但三者作用温度范围差异较大。如图 5 所示，三者柔性从大到小依次为 5E9A>6Y2K>6LVW。在 GH42 家族 β-半乳糖苷酶包含的三个结构域（Domain A、Domain B 和 Domain C）中[6]，6LVW、6Y2K 和 5E9A 柔性差异在 C-末端最明显，位于 Domain C。同时，三者在 400 aa 氨基酸位点附近，即 Domain A 与 Domain B 链接处存在明显差异。其中，6Y2K 与 5E9A 相比，二者最适作用温度相近（均为 4~5 ℃），但 ΔB'-factor 相差较大（±10）。现有研究表明，6Y2K 作用温度范围广、热稳定性高，并以六聚体形态存在，使其成为少见地兼具低温催化活性和热稳定性的酶[38]。但本研究对比 6Y2K 和 5E9A 结构发现，6Y2K 分子结构中的氢键数约为 5E9A 的 6 倍，其单体结构刚性大于 5E9A。同时，6Y2K 在 Domain A 与 Domain B 链接处的柔性大于 5E9A，而在 C-末端柔性显著低于 5E9A。由此可

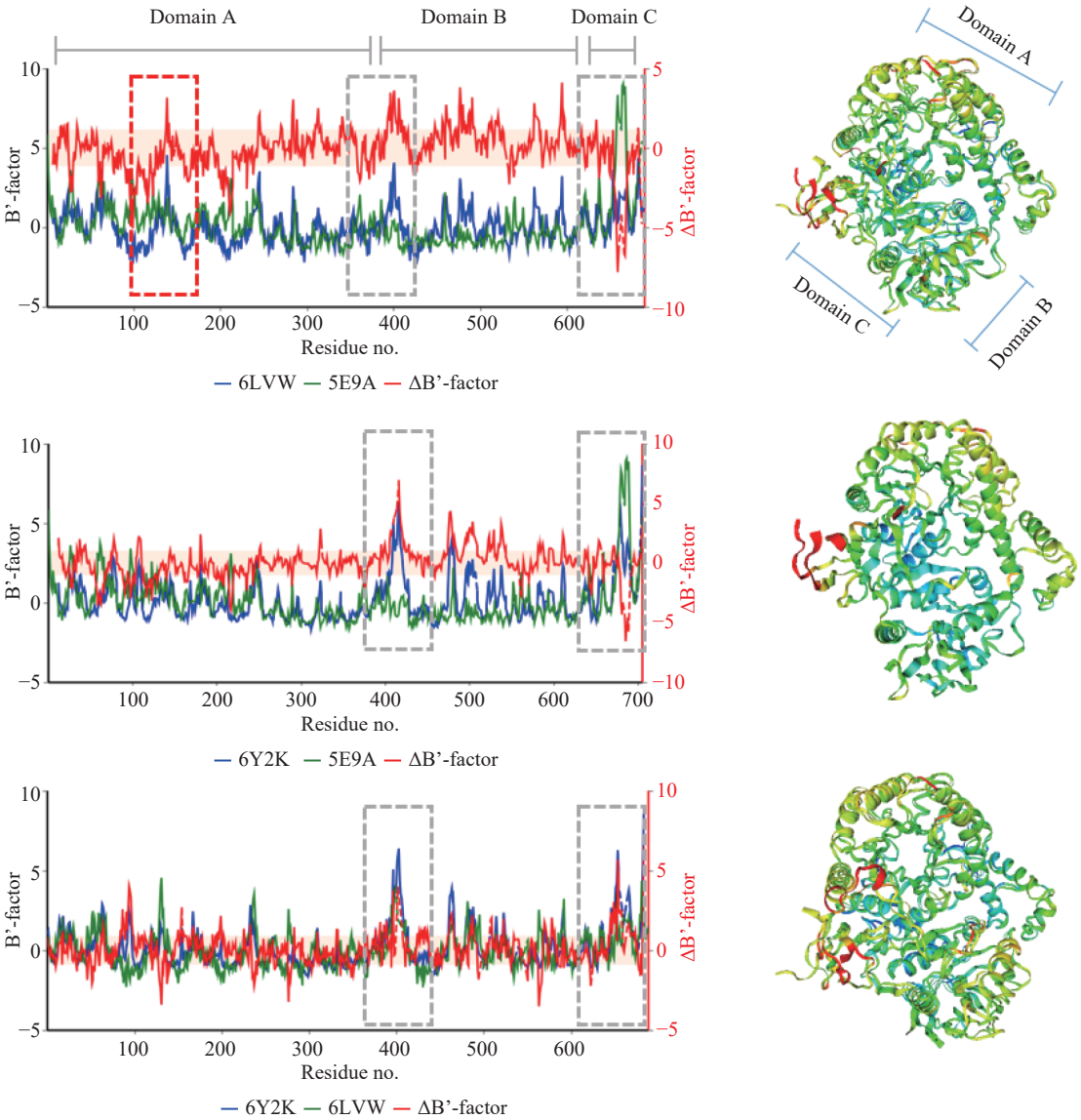


图 5　6LVW、6Y2K 和 5E9A 分子结构柔性对比

Fig.5　Comparison of the molecular structure flexibility of 6LVW, 6Y2K and 5E9A

知，除了氢键数目、单体聚合形态这两个影响酶分子结构稳定性的普遍因素外，C-末端对稳定性的影响为 GH42 家族特有因素。6LVW 与 6Y2K 相比，6Y2K 氢键数量是 6LVW 的 6.7 倍，但其分子柔性仍大于 6LVW。这与二者的温度适应特性相符，6LVW 虽来自嗜冷微生物，且低温下可以保持活性，但其最适作用温度范围为 50~55 ℃，与耐热酶相似，表明 6LVW 单体分子结构刚性是其获得耐热特性的主要因素。6LVW 与 5E9A 相比，ΔB'-factor 相差较小(±5)，结构柔性整体较相似。除了 Domain A 与 Domain B 链接处、C-末端，二者在 Domain A 上增加了柔性显著的区域，但仅 C-末端的柔性降低对 6LVW 刚性提高具有正向作用。通过上述对比分析可知，GH42 家族嗜冷微生物来源 β-半乳糖苷酶，在 Domain A 与 Domain B 链接处以及 C-末端存在共性的柔性差异显著位点区域，其中，C-末端对耐低温酶稳定性影响作用为 GH42 家族特有因素。另外，Domain A 主要由保守的 TIM 桶状催化结构域构成，是糖苷水解酶家族保守的祖先分子，Domain A 与 Domain B 链接处的柔性差异在进化上的作用和意义有待深入探讨。

2.5.2　耐热酶 β-半乳糖苷酶分子结构对比　1KWK 和 4OIF 同为 GH42 家族耐热 β-半乳糖苷酶，并均以三聚体形态存在，但二者最适作用温度相差较大，1KWK 最适作用温度为 70 ℃，高于 4OIF 最适作用温度(53 ℃)。现有研究表明，提高分子刚性可以提高酶的耐热性[53]，由此推测 1KWK 分子刚性大于 4OIF，即 4OIF 分子柔性大于 1KWK。而对二者结构柔性差异分析结果发现(图 6)，1KWK 分子结构柔性大于 4OIF，特别是 Domain A 区域较显著。这似乎与二者耐热特性不符。但进一步分析可以发现，1KWK 氢键数量为 4OIF 3.7 倍。同时，4OIF 分子中提高分子结构刚性的氨基酸 P 含量相对减少。由此可知，与 4OIF 相比，1KWK 通过提高氢键数量及氨基酸 P 含量增强分子刚性，并表现出更高的最适作用温度。

另外，4OIF、3TTS 和 6LVW 三者最适作用温度较接近，分别是 53、55、55 ℃。其中，3TTS 来自 *B. circulans* 菌属，但却是目前家族中与 4OIF 序列相似度最高的结构，进化时间也较接近(图 3)。3TTS 单体分子结构柔性虽然大于 4OIF，但其以六聚体形态存在，提高稳定性。二者比较结果表明，六聚体形态弥补了单体结构刚性不足，使 3TTS 与耐热酶 4OIF 具有相同的最适作用温度。4OIF 与 6LVW 结构相比，4OIF 结构柔性虽然大于 6LVW，但氢键数量为后者的 1.35 倍。单体结构柔性与氢键数量综合作用结果为，4OIF 最适作用温度与 6LVW 接近并略低于后者。相反地，将 4OIF 与最适作用温度较低家族成员 4UCF(40 ℃)和 5XB7(30 ℃)相比，4OIF 单体结构柔性仍大于二者，但其氢键数量在三者中最高，提高了 4OIF 分子结构稳定性，使其最适作用温度高于 4UCF 和 5XB7。由此可知，耐热酶对温度的适应性是由单体结构柔性、氢键数量及聚合态形式共同作用的效果。提高酶结构单体分子刚性，增大聚合态单体数量及氢键数量，可以成为提高 GH42 家族 β-半乳糖苷酶耐热性的有效策略。

2.5.3　成对进化耐热与耐低温 β-半乳糖苷酶之间分子结构比较　6Y2K 与 1KWG，5E9A 与 4OIF 分别是进化不同时期“成对”出现且具有较高结构相似度的耐低温和耐热 β-半乳糖苷酶(图 3)。“成对”酶之间表面电荷无明显差异，由于表面电荷影响酶蛋白对盐的耐受程度，由此推测“成对”酶耐盐特性可能比较接近，但目前尚无相关研究数据报道验证。6Y2K-1KWG 与进化后期出现的 5E9A-4OIF 相比，进化前期的“成对酶”柔性大且氢键数量多。两组成对进化酶中，耐低温酶分子结构柔性均大于耐热酶。表明对于同期进化、具有保守分子结构的耐低温和耐热酶而言，分子结构柔性程度是造成酶对温度产生适应性分化的主要因素。其中，6Y2K-1KWG 柔性差异波动在 Domain B 和 Domain C 区域起伏较大，且在 Domain A 与 Domain B 链接处，C-末端柔性差异较显著；5E9A-4OIF 在 Domain A 区域柔性差异较明

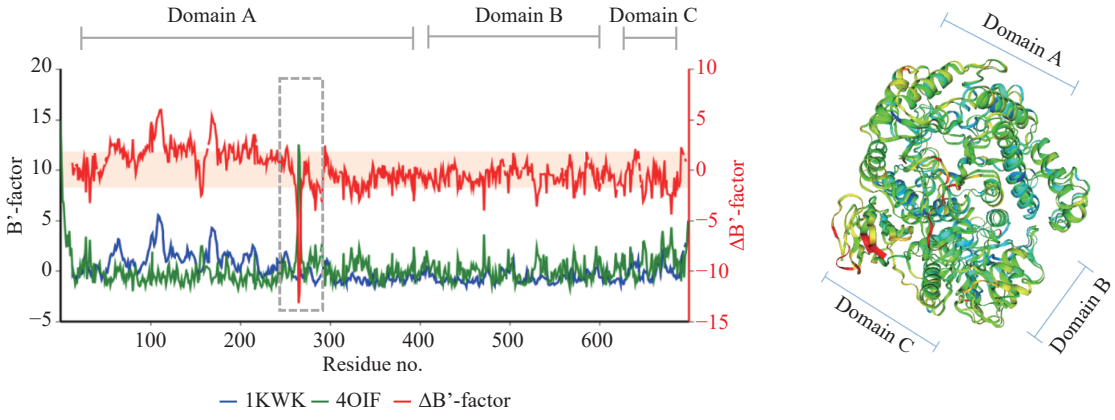


图 6　耐热 β-半乳糖苷酶 1KWG 与 4OIF 分子结构柔性比较

Fig.6　Comparison of the molecular structure flexibility between thermaostable β-galactosidase 1KWG and 4OIF

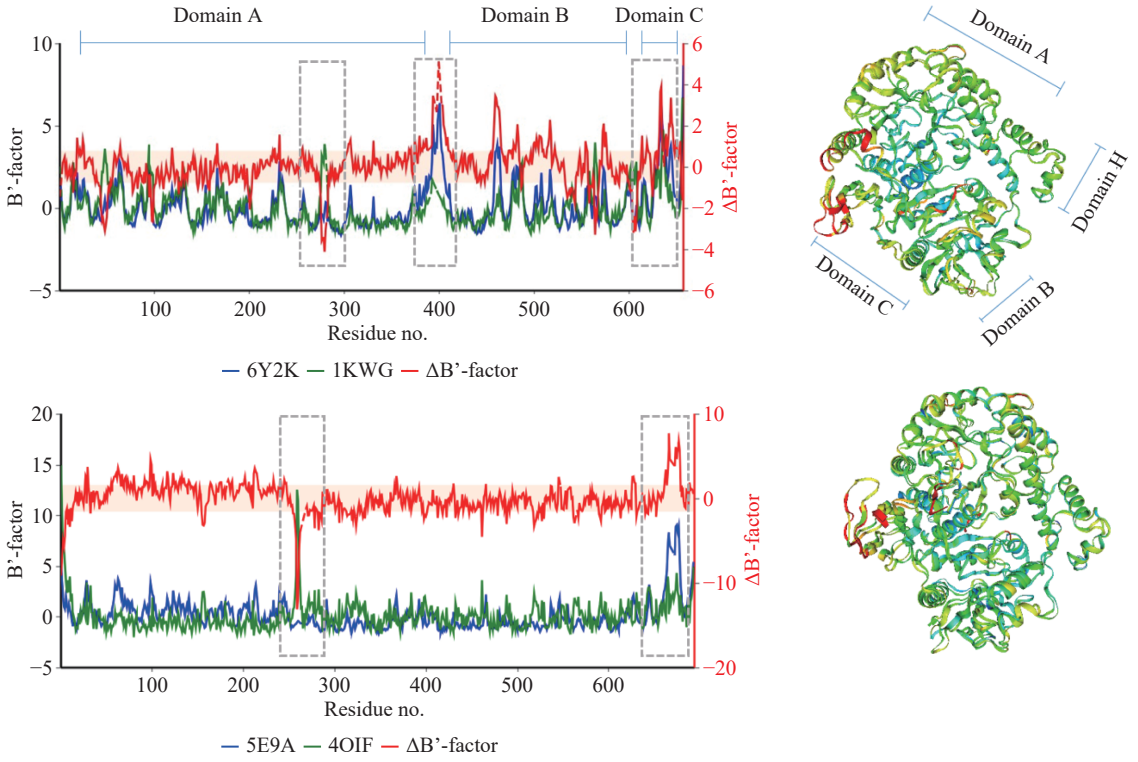


图 7　GH42 家族成对进化耐热与耐低温 β-半乳糖苷酶之间结构柔性比较

Fig.7　Comparison of structural flexibility between thermostable and cold-stable β-galactosidases in GH42 family

显，且同样在 C-末端存在显著性差异，但 Domain A 与 Domain B 链接处未出现显著差异（图 7）。另外，耐热酶相对于其成对进化的耐低温酶，均在 Domain A 的 300 aa 位点附近，即 TIM 桶状结构域第 6 和第 7 个 β-片层之间，存在耐热酶柔性异常增大的位点。

3　结论

本研究结果显示，与其它糖苷水解酶家族相比，GH42 家族 β-半乳糖苷酶氨基酸组成具有偏好性。其中，酸性、带负电荷的氨基酸 E 含量高，而带正电荷的碱性氨基酸 K 含量低，使 GH42 家族 β-半乳糖苷酶具有相对较低 pI，更适应其所来源的嗜极性细菌和古细菌所处早期高盐进化环境。与预期假设不同，GH42 家族 β-半乳糖苷酶进化并未按照来源微生物对环境的适应性进行聚类。相反地，*Marinomonas* ef1 来源耐低温酶 6Y2K 与 *Thermus* sp. A4 来源耐热酶 1KWG，以及 *Rahnella* sp. R3 来源耐低温酶 5E9A 与 *G. stearothermophilus* T-6 来源耐热酶 4OIF，分别在不同时期呈现出“成对”进化现象。“成对”进化的耐热酶与耐低温酶相比，耐低温酶分子结构表面 GRAVY 值和内部 GRAVY 值均低于耐热酶，符合耐低温酶表面亲水性较强，耐热酶分子内部疏水性较强的规律。结合“成对”酶分子骨架 Cα 的较高保守性，表明 GH42 家族可以基于保守分子结构，通过分子内部与外部的疏水性差异分化出耐低温及耐热 β-半乳糖苷酶。同时，GH42 家族耐低温 β-半乳糖苷酶，在 TIM 催化结构域与 Domain B 链接处以及 C-末端存在共性的柔性差异显著区域；而耐热酶则通过提高氢键数量及氨基酸 P 含量增强单体刚性，并提高作用温度。因此，GH42 家族酶分子对温度的适应性是其结构柔性、氢键数量及聚合态共同作用的结果。

本研究以 GH42 家族已知晶体结构 β-半乳糖苷酶为研究对象，基于家族酶分子结构进化保守性，分析成员酶之间催化特性差异产生的结构原因，为 GH42 家族 β-半乳糖苷酶嗜极性催化特性的进化机制研究及多元耐受特性的工程酶开发提供通用性参考。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] MIAO M, YAO Y, YAN Q, et al. Biochemical characterization of a novel β-galactosidase from *Pedobacter* sp. with strong transglycosylation activity at low lactose concentration[J]. Folia Microbiologica, 2024, 69(6): 1319−1330.

[2] MOVAHEDPOUR A, AHMADI N, GHALAMFARSA F, et al. β-galactosidase: From its source and applications to its recombinant form[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022, 69(2): 612−628.

[3] HAMELEERS L, PIJNING T, GRAY B B, et al. Novel β-galactosidase activity and first crystal structure of glycoside hydrolase family 154[J]. New Biotechnology, 2024, 80: 1−11.

[4] CARNEIRO L, WURMAN J, DUPREE P, et al. The glycoside hydrolase family 35 β-galactosidase from *Trichoderma reesei*

debranches xyloglucan oligosaccharides from tamarind and jatobá [J]. Biochimie, 2023, 211: 16−24.
[5] GOTOH A, HIDAKA M, SAKURAMA H, et al. Substrate recognition mode of a glycoside hydrolase family 42 β-galactosidase from *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* (BiBga42A) revealed by crystallographic and mutational analyses[J]. Microbiome Research Reports, 2023, 2(3): 20.
[6] HIDAKA M, FUSHINOBU S, OHTSU N, et al. Trimeric crystal structure of the glycoside hydrolase family 42 β-galactosidase from *Thermus thermophilus* A4 and the structure of its complex with galactose[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 322(1): 79−91.
[7] LAYE V J, DASSARMA S. Double mutations far from the active site affect cold activity in an antarctic halophilic β-galactosidase[J]. Protein Science, 2022, 31(3): 677−687.
[8] SUN J, YAO C, LI Y, et al. A novel salt-tolerant GH42 β-galactosidase with transglycosylation activity from deep-sea metagenome[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(9): 154.
[9] MAKSIMAINEN M, PAAVILAINEN S, HAKULINEN N, et al. Structural analysis, enzymatic characterization, and catalytic mechanisms of β-galactosidase from *Bacillus circulans* sp. *alkalophilus*[J]. The FEBS Journal, 2012, 279(10): 1788−1798.
[10] PÁEZ-PÉREZ E D, HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ A, ALFARO-SALDAÑA E, et al. Disorder and amino acid composition in proteins: their potential role in the adaptation of extracellular pilins to the acidic media, where *Acidithiobacillus thiooxidans* grows[J]. Extremophiles, 2023, 27(3): 31.
[11] BARTHELS F, SCHIRMEISTER T, KERSTEN C. BANΔIT: B'-factor analysis for drug design and structural biology [J]. Molecular Informatics, 2021, 40(1): e2000144.
[12] TAMAKI F K, SOUZA D P, SOUZA V P, et al. Using the amino acid network to modulate the hydrolytic activity of β-glycosidases[J]. Plos One, 2016, 11(12): e0167978.
[13] AGUILAR C F, SANDERSON I, MORACCI M, et al. Crystal structure of the β-glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 271(5): 789−802.
[14] TROFIMOV A A, POLYAKOV K M, TIKHONOV A V, et al. Structures of β-glycosidase from *Acidilobus saccharovorans* in complexes with tris and glycerol[J]. Doklady. Biochemistry and Biophysics, 2013, 449: 99−101.
[15] SINGH A K, PLUVINAGE B, HIGGINS M A, et al. Unravelling the multiple functions of the architecturally intricate *Streptococcus pneumoniae* β-galactosidase, BgaA[J]. Plos Pathogens, 2014, 10(9): e1004364.
[16] CHOI J Y, HONG H, SEO H, et al. High galacto-oligosaccharide production and a structural model for transgalactosylation of β-galactosidase II from *Bacillus circulans*[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(47): 13806−13814.
[17] ISHIKAWA K, KATAOKA M, YANAMOTO T, et al. Crystal structure of β-galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the construction of the thermophilic mutants[J]. The FEBS Journal, 2015, 282(13): 2540−2552.
[18] RUTKIEWICZ-KROTEWICZ M, PIETRZYK-BRZEZINSKA A J, SEKULA B, et al. Structural studies of a cold-adapted dimeric β-D-galactosidase from *Paracoccus* sp. 32d[J]. Acta Crystallographica Section D, Structural Biology, 2016, 72(Pt 9): 1049−1061.
[19] JUERS D H, JACOBSON R H, WIGLEY D, et al. High resolution refinement of β-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for alpha-complementation[J]. Protein Science, 2000, 9(9): 1685−1699.
[20] PEREIRA-RODRIGUEZ A, FERNÁNDEZ-LEIRO R, GONZÁLEZ-SISO M I, et al. Structural basis of specificity in tetrameric *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase[J]. Journal of Structural Biology, 2012, 177(2): 392−401.
[21] SKÁLOVÁ T, DOHNÁLEK J, SPIWOK V, et al. Cold-active β-galactosidase from *Arthrobacter* sp. C2-2 forms compact 660 kDa hexamers: Crystal structure at 1.9A resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 353(2): 282−294.
[22] MÍGUEZ AMIL S, JIMÉNEZ-ORTEGA E, RAMÍREZ-ESCUDERO M, et al. The cryo-EM structure of *Thermotoga maritima* β-galactosidase: Quaternary structure guides protein engineering[J]. ACS Chemical Biology, 2020, 15(1): 179−188.
[23] MAKSIMAINEN M, HAKULINEN N, KALLIO J M, et al. Crystal structures of *Trichoderma reesei* β-galactosidase reveal conformational changes in the active site[J]. Journal of Structural Biology, 2011, 174(1): 156−163.
[24] ROJAS A L, NAGEM R A, NEUSTROEV K N, et al. Crystal structures of β-galactosidase from *Penicillium* sp. and its complex with galactose[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 343(5): 1281−1292.
[25] MAKSIMAINEN M M, LAMPIO A, MERTANEN M, et al. The crystal structure of acidic β-galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2013, 60: 109−115.
[26] RICO-DÍAZ A, RAMÍREZ-ESCUDERO M, VIZOSO-VÁZQUEZ Á, et al. Structural features of *Aspergillus niger* β-galactosidase define its activity against glycoside linkages[J]. The FEBS Journal, 2017, 284(12): 1815−1829.
[27] HENZE M, YOU D J, KAMERKE C, et al. Rational design of a glycosynthase by the crystal structure of β-galactosidase from *Bacillus circulans* (BgaC) and its use for the synthesis of N-acetyllactosamine type 1 glycan structures[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 191: 78−85.
[28] OHTO U, USUI K, OCHI T, et al. Crystal structure of human β-galactosidase: structural basis of gm1 gangliosidosis and morquio B diseases[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(3): 1801−1812.
[29] CHENG W, WANG L, JIANG Y L, et al. Structural insights into the substrate specificity of *Streptococcus pneumoniae* β(1, 3)-galactosidase BgaC[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(27): 22910−22918.
[30] VIEIRA P S, BONFIM I M, ARAUJO E A, et al. Xyloglucan processing machinery in *Xanthomonas* pathogens and its role in the transcriptional activation of virulence factors[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 4049.
[31] LARSBRINK J, THOMPSON A J, LUNDQVIST M, et al. A complex gene locus enables xyloglucan utilization in the model saprophyte *Cellvibrio japonicus*[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(2): 418−433.
[32] GORELIK A, ILLES K, HASAN S M N, et al. Structure of the murine lysosomal multienzyme complex core[J]. Science Advances, 2021, 7(20): eabf4155.
[33] FAN Y, HUA X, ZHANG Y, et al. Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted β-galactosidase from *Rahnella* sp. R3[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 115: 158−164.

[34] SOLOMON H V, TABACHNIKOV O, FEINBERG H, et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of GanB, a GH42 intracellular β-galactosidase from *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, 2013, 69(Pt 10): 1114−1119.
[35] GODOY A S, CAMILO C M, KADOWAKI M A, et al. Crystal structure of β1→6-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* S17: Trimeric architecture, molecular determinants of the enzymatic activity and its inhibition by α-galactose[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(22): 4097−4112.
[36] VIBORG A H, FREDSLUND F, KATAYAMA T, et al. A β1-6/β1-3 galactosidase from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bl-04 gives insight into sub-specificities of β-galactoside catabolism within *Bifidobacterium*[J]. Molecular Microbiology, 2014, 94(5): 1024−1040.
[37] KARAN R, MATHEW S, MUHAMMAD R, et al. Understanding high-salt and cold adaptation of a polyextremophilic enzyme[J]. Microorganisms, 2020, 8(10): 1594.
[38] MANGIAGALLI M, LAPI M, MAIONE S, et al. The co-existence of cold activity and thermal stability in an antarctic GH42 β-galactosidase relies on its hexameric quaternary arrangement[J]. The FEBS Journal, 2021, 288(2): 546−565.
[39] SHIPKOWSKI S, BRENCHLEY J E. Bioinformatic, genetic, and biochemical evidence that some glycoside hydrolase family 42 β-galactosidases are arabinogalactan type I oligomer hydrolases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(12): 7730−7738.
[40] ALENDÉ N, NIELSEN J E, SHIELDS D C, et al. Evolution of the isoelectric point of mammalian proteins as a consequence of indels and adaptive evolution[J]. Proteins, 2011, 79(5): 1635−1648.
[41] SENGUPTA A, DAS K, JHA N, et al. Molecular evolution steered structural adaptations in the DNA polymerase III α subunit of halophilic bacterium *Salinibacter ruber*[J]. Extremophiles, 2023, 27(2): 20.
[42] KRANE S M. The importance of proline residues in the structure, stability and susceptibility to proteolytic degradation of collagens[J]. Amino Acids, 2008, 35(4): 703−710.
[43] PISZKIN L, BOWMAN J. Extremophile enzyme optimization for low temperature and high salinity are fundamentally incompatible[J]. Extremophiles, 2021, 26(1): 5.
[44] MOHAMMADI S, PARVIZPOUR S, RAZMARA J, et al. Structure prediction of a novel exo-β-1,3-glucanase: Insights into the cold adaptation of psychrophilic yeast *Glaciozyma antarctica* PI12[J]. Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences, 2018, 10(1): 157−168.
[45] ISOGAI Y, IMAMURA H, SUMI T, et al. Improvement of protein solubility in macromolecular crowding during myoglobin evolution[J]. Biochemistry, 2022, 61(15): 1543−1547.
[46] GUSEMAN A J, SPEER S L, PEREZ GONCALVES G M, et al. Surface charge modulates protein-protein interactions in physiologically relevant environments[J]. Biochemistry, 2018, 57(11): 1681−1684.
[47] CHEN C, LIU Q, YUAN Y, et al. Protein-mediated DNA self-assembly by controlling the surface charge in a molecular crowding environment[J]. Biomaterials Science, 2022, 10(8): 2006−2013.
[48] VALLINA ESTRADA E, OLIVEBERG M. Physicochemical classification of organisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2022, 119(19): e2122957119.
[49] GEORLETTE D, BLAISE V, COLLINS T, et al. Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(1): 25−42.
[50] GIANESE G, BOSSA F, PASCARELLA S. Comparative structural analysis of psychrophilic and meso-and thermophilic enzymes[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2002, 47(2): 236−249.
[51] HANEY P J, BADGER J H, BULDAK G L, et al. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic methanococcus species[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(7): 3578−3583.
[52] BRININGER C, SPRADLIN S, COBANI L, et al. The more adaptive to change, the more likely you are to survive: protein adaptation in extremophiles[J]. Seminars in Cell & Developmental Biology. Academic Press, 2018, 84: 158−169.
[53] SUN Z, LIU Q, QU G, et al. Utility of B-factors in protein science: interpreting rigidity, flexibility, and internal motion and engineering thermostability[J]. Chemical Reviews, 2019, 119(3): 1626−1665.
[54] HONG S Y, YOON J, AN Y J, et al. Statistical analysis of the role of cavity flexibility in thermostability of proteins[J]. Polymers, 2024, 16(2): 291.
[55] LIU Y, JIA K, CHEN H, et al. Cold-adapted enzymes: mechanisms, engineering and biotechnological application[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2023, 46(10): 1399−1410.