

定点突变提高土曲霉 *Aspergillus terreus* 脂肪酶的催化活性

张晓凤, 喻晓蔚, 徐岩

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

张晓凤, 喻晓蔚, 徐岩. 定点突变提高土曲霉 *Aspergillus terreus* 脂肪酶的催化活性. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1091–1105.
Zhang XF, Yu XW, Xu Y. Improvement of catalytic activity of *Aspergillus terreus* lipase by site-directed mutagenesis. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1091–1105.

摘要: 本研究旨在利用理性设计的方法来提高来源于土曲霉 *Aspergillus terreus* 的酸性脂肪酶 ATL 的催化活力。通过同源比对, 选择脂肪酶盖子区域和底物结合口袋域中的位点进行定点突变, 得到 8 种 ATL 的突变脂肪酶。结果发现, 盖子区域突变酶 ATLLid 与底物结合口袋域突变酶 ATLV218W 的催化活性显著提高。ATLLid 和 ATLV218W 对底物对硝基苯酚月桂酸酯 *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL) 的催化活性最高, k_{cat} 值较 ATL 分别提高了 39.37 倍和 50.79 倍, k_{cat}/K_m 值较 ATL 分别提高了 2.85 倍和 8.48 倍。与 ATL 相比, ATLLid 和 ATLV218W 的热稳定性略有下降, 最适 pH 为 5.0, pH 4.0–8.0 具有较好的稳定性, 说明突变未对 ATL 的嗜酸耐酸特性产生影响。通过同源建模模拟及分子对接技术分析底物 *p*-NPL 与酶分子间的相互作用, 解析了 ATLLid 和 ATLV218W 催化活性提高的机理。

关键词: 土曲霉脂肪酶, 毕赤酵母, 同源建模, 定点突变, 催化活性, 分子对接

Improvement of catalytic activity of *Aspergillus terreus* lipase by site-directed mutagenesis

Xiaofeng Zhang, Xiaowei Yu, and Yan Xu

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: The catalytic activity of *Aspergillus terreus* lipase (ATL) was improved by rational design. According to the sequence analysis and homologous modeling, several amino acids involved in the lid domain and substrate binding pocket

Received: January 24, 2018; **Accepted:** April 3, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31671799), Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (No. NY-010), 333 Project in Jiangsu Province (No. BRA2015316), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA022207).

Corresponding author: Xiaowei Yu. Tel/Fax: +86-510-85918201; E-mail: bioyuxw@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 31671799), 江苏省“六大人才高峰”项目 (No. NY-010), 江苏省“333 工程”项目 (No. BRA2015316), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA022207) 资助。

网络出版时间: 2018-04-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20180424.1007.002.html>

domains of the acidic lipase ATL were mutated by site-directed mutagenesis, and eight mutants were constructed. These mutants and the wild type lipase ATL were expressed in *Pichia pastoris* GS115 and the enzymatic properties were characterized. The mutants ATLLid and ATLV218W exhibited higher hydrolytic activity than ATL towards *p*-nitrophenyl laurate. The k_{cat} values of ATLLid and ATLV218W towards *p*-nitrophenyl laurate were 39.37- and 50.79-fold higher, and the $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ values were 2.85- and 8.48-fold higher than the wild type, respectively. Although thermostability of these mutants decreased slightly, ATLLid and ATLV218W still exhibited the maximum activity at pH 5.0 and high stability in a broad range of pH (4.0–8.0), which were similar to the wild type. Using homologous modeling and molecular docking technology the mechanism for the improvement of catalytic activity was analyzed. These findings not only shed light on the relationship between the lid domain/substrate binding pocket domain and catalytic activity but also provided comprehensive scheme for further engineering to gain more efficient lipases.

Keywords: *Aspergillus terreus* lipase, *Pichia pastoris*, homologous modeling, site-directed mutagenesis, catalytic activity, molecular docking

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 又称甘油三酯水解酶, 广泛分布于自然界中, 是一类能在油水界面或水不溶系统进行酯类水解或酯类合成的酶^[1]。脂肪酶在食品、化工、医药、饲料等领域得到了广泛的应用, 因而对脂肪酶的催化活性提出了更高的要求。多数脂肪酶的最适作用 pH 在中偏碱性条件下, 然而, 研究人员发现在酸性条件下具有较高催化活性的酸性脂肪酶具有重要的工业应用价值。例如, 在医药行业中, 酸性脂肪酶可用于治疗胃肠紊乱、消化不良等疾病^[2]; 在食品行业中, 酸性脂肪酶可在适当条件下产生低级脂肪酸等风味物质, 增强食品香味^[3]; 在饲料行业中, 在幼畜幼禽的饲料中添加脂肪酶可以有效解决幼畜因消化机能尚未发育健全、内源性脂肪酶分泌量不足而导致的早期断奶产生的明显应激, 避免对消化系统发育和消化酶分泌产生不良影响, 并能提高饲料内脂肪类物质的利用率^[4]。

曲霉属脂肪酶在酸性环境中表现出良好的催化活性和耐受性, 是获取高性能酸性脂肪酶的重要来源之一^[5-8]。其中对于黑曲霉来源的酸性脂肪酶研究更为广泛, 如产自黑曲霉 *Aspergillus niger* AN0512 的脂肪酶在 pH 5.0 时催化活性最高, 且在 pH 3.0–7.0 范围内保持良好的稳定性^[9]; 产自 *A. niger* NICM 1207 的脂肪酶在 pH 2.5 和 45–50 °C 条件下水解活力最高, 且在 pH 2.5–9.0

范围内可保持较高活性^[5]。然而, 黑曲霉来源的酸性脂肪酶生产工艺^[10]和工业应用领域^[11]存在专利壁垒, 因此亟待开发其他来源的酸性脂肪酶, 为工业应用提供更多的酶源选择。Shi 等^[7]发现了一种来自土曲霉 *Aspergillus terreus* 的酸性脂肪酶 ATL, 但仅对其进行了酶学特性研究。ATL 具有良好的耐酸性能, 其最适 pH 为 4.0, 且在 pH 3.0–12.0 范围内活力稳定。但是 *A. terreus* 发酵脂肪酶活力较低, 仅为 13.7 U/mL, 而且该酶催化活性低, 比活力为 24 U/mg^[7]。

脂肪酶的盖子区域对酶活具有重要的影响。研究表明, 对脂肪酶盖子区域进行替换或定点突变等蛋白质工程改造可使脂肪酶的催化活性和底物特异性发生变化。对来自 *Proteus* sp. 的脂肪酶基因 LipK107 的盖子区域进行定点突变, 发现突变酶 E130L+K131I 和 T138V 的盖子区域疏水性增强, 酶活性显著增强; 突变酶 I128E+V129D 却使得盖子区域疏水性减弱, 相应的酶活也有所降低^[12]。说明盖子的氨基酸亲疏水性对酶活具有重要影响作用。Skjøt 等将南极假丝酵母 *Candida antarctica* 脂肪酶 B (CALB) 的“盖子”替换成与其同源的来自粗糙链孢霉 *Neurospora crassa* 和玉米赤霉 *Gibberella zeae* 脂肪酶的相应的“盖子”, 使得突变酶底物特异性发生改变, 提高了对短链酯的水解活性, 并且水解外消旋 2-苯甲酸氨基乙酯

的立体选择性增强^[13]。说明盖子的结构可以改变脂肪酶的活性、底物特异性等方面的性质。此外,脂肪酶的某些保守氨基酸也会对酶活产生影响。Mosbah 等为了研究 Gly311 位点对脂肪酶的作用,将该位点突变成 Leu、Trp、Asp 和 Lys,结果突变酶的酶活都降低了,且突变酶的最适 pH 也发生了改变^[14]。

本研究将土曲霉 *A. terreus* 来源的酸性脂肪酶基因进行密码子优化,并在真核外源蛋白表达系统毕赤酵母中进行表达,通过 ATL 三维结构模拟及多序列同源比对,利用理性设计的方法在脂肪酶的盖子区域和底物结合口袋域选择关键位点进行定点突变,以期提高 ATL 的催化活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *E. coli* JM109 和巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 由本实验室保存,分别用于载体扩增和目的蛋白外源表达。表达载体 pPIC9K 由本实验室保存。土曲霉 *A. terreus* 脂肪酶基因 ATL 序列 (GenBank Accession No. XP_001218444.1) 根据毕赤酵母的密码子偏好性优化后,由南京金斯瑞公司合成。

1.1.2 培养基

大肠杆菌培养基 LB: 0.5% (W/V) 酵母浸出粉, 1% (W/V) 胰蛋白胨, 1% (W/V) NaCl, 根据需要添加 100 μg/mL 氨苄青霉素 (Amp)。酵母培养基 YPD、YPD-G418、MD、BMGY 和 BMMY 根据“Invitrogen 公司操作手册”方法配制。

1.1.3 酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、PCR 试剂购自 TaKaRa 宝生物公司。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR Purification Kit、Gel Extraction Kit、

Plasmid Mini Kit I 购自 OMEGA BIO-TEK。对硝基苯酚酯 *p*-nitrophenyl 系列底物: 对硝基苯酚乙酸酯 *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA)、对硝基苯酚丁酸酯 *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB)、对硝基苯酚戊酸酯 *p*-nitrophenyl valerate (*p*-NPV)、对硝基苯酚辛酸酯 *p*-nitrophenyl caprylate (*p*-NPC)、对硝基苯酚月桂酸酯 *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL)、对硝基苯酚豆蔻酸酯 *p*-nitrophenyl myristate (*p*-NPM) 和对硝基苯酚棕榈酸酯 *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP) 购自 Sigma-Aldrich 中国公司。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 定点突变、重组表达质粒及工程菌的构建

从 NCBI 基因数据库中检索到 ATL 基因 (GenBank 登录号 No. XP_001218444.1), 以毕赤酵母密码子偏好性进行优化, 将优化基因送南京金斯瑞公司合成, 并在 *P. pastoris* GS115 中表达。利用限制性内切酶 *Not* I 和 *Avr* II 分别对合成的 ATL 基因 DNA 片段和 pPIC9K 空载体进行双酶切, 利用 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 涂布于 LB 平板 (含 100 μg/mL 的 Amp), 筛选出阳性转化子, 并提取得到重组质粒 pPIC9K-ATL。pPIC9K-ATL 经限制性内切酶 *Sal* I 线性化后, 利用电转化法 (1 500 V, 5 ms) 把重组质粒转化到宿主菌 *P. pastoris* GS115 中, 并将转化物涂布于 MD 平板 (含 250 μg/mL 的 G418), 30 °C 培养 2-3 d 后, 可挑取较大的阳性转化子菌落, 提取酵母基因组利用引物 3'AOX1 和 5'AOX1 进行 PCR 验证, 得到正确的重组菌株 GS115/pPIC9K-ATL。具体电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

以 pPIC9K-ATL 为模板, 分别以 Lid-F 和 Lid-R 上下游引物 (引物序列见表 1) 进行全质粒 PCR, 得到突变后的质粒 pPIC9K-ATL^{Lid}。反应体

系为:模板 1 μL ; PrimerSTAR HS 25 μL ; 20 mmol/L 的上下游引物各 1 μL ; 加无菌水至总体积为 50 μL 。反应条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 11 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物经 PCR Purification Kit 试剂盒纯化后, 限制性内切酶 *Dpn* I 对 PCR 产物消化以降模板质粒, 再经过 PCR Purification Kit 试剂盒纯化后, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞。涂布于 LB 平板 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Amp), 筛选出阳性转化子, 可获得突变质粒 pPIC9K-ATLLid。其余 7 种突变质粒均按照

该方法进行构建 (引物序列见表 1), 分别得到不同的突变质粒: pPIC9K-ATLV218F、pPIC9K-ATLV218W、pPIC9K-ATLV218L、pPIC9K-ATLV218D、pPIC9K-ATLV218M、pPIC9K-ATLV218A、pPIC9K-ATLBP2。将突变后的质粒参考上述构建重组菌株 GS115/pPIC9K-ATL 的方法, 得到 8 株突变株, 分别为 GS115/pPIC9K-ATLLid、GS115/pPIC9K-ATLV218F、GS115/pPIC9K-ATLV218W、GS115/pPIC9K-ATLV218L、GS115/pPIC9K-ATLV218D、GS115/pPIC9K-ATLV218M、GS115/pPIC9K-ATLV218A 和 GS115/pPIC9K-ATLBP2。

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'-3')	Size (bp)
Lid-F	TTTTGTCTTTCAGAGGTTCTTCTACTATTA AAAA ACTGGATCGCTAATTTGGATTTCT AT	58
Lid-R	ATGAAATCCAAATTAGCGATCCAGTTT TTTA ATAGTAGAAGAACCTCTGAAAGAC AAAA	58
BP1-V218F-F	CTAGATTGCCACCTGAGGCTTTTGGTTACAGACACCCATCTCCT	44
BP1-V218F-R	AGGAGATGGGTGTCTGTAAACCA AAA AGCCTCAGGTGGCAATCTAG	44
BP1-V218W-F	CGTTCCTAGATTGCCACCTGAAGCTTGGGGATACAGACACCCATCTCCTGAATA	54
BP1-V218W-R	TATTCAGGAGATGGGTGTCTGTATCCCAAGCTTCAGGTGGCAATCTAGGAACG	54
BP1-V218L-F	CTAGATTGCCACCTGAGGCTTTAGGTTACAGACACCCATCTCCT	44
BP1-V218L-R	AGGAGATGGGTGTCTGTAAACCTAAAGCCTCAGGTGGCAATCTAG	44
BP1-V218D-F	CTAGATTGCCACCTGAGGCTGACGGTTACAGACACCCAAGT	41
BP1-V218D-R	ACTTGGGTGTCTGTAAACCGT C AGCCTCAGGTGGCAATCTAG	41
BP1-V218M-F	CTAGATTGCCACCTGAGGCTATGGGATACAGACATCCATCTC	42
BP1-V218M-R	GAGATGGATGTCTGTATCCCATAGCCTCAGGTGGCAATCTAG	42
BP1-V218A-F	CTAGATTGCCACCTGAGGCTGCTGGTTACAGACACCCAAGTCCT	44
BP1-V218A-R	AGGACTTGGGTGTCTGTAAACCA GC AGCCTCAGGTGGCAATCTAG	44
BP2-F	CTTCTCCTGATGCTTCTGCTCACTTGTGGTACTTTTTCGCTATTTCTGAGTGT TGTTGGGTCTTCTCATCACCATCACCATCAC	86
BP2-R	GTGATGGTGATGGTGATGAGAAGAACCA CAAA CACTCAGAAATAGCGAAA AAGTACCACAAGTGAGCAGAAGCATCAGGAGAAG	86
3'-AOX1	GCAAATGGCATTCAATTCTGACATCC	25
5'-AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	21

The mutation sites are highlighted by bold.

1.2.2 脂肪酶的表达及蛋白纯化

将重组菌株在含有 250 $\mu\text{g/mL}$ G418 的 YPD 平板上划线, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2–3 d。挑取一环平板上的单菌落, 接种至 25 mL BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 16–20 h 至 OD_{600} 为 2–6。6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体并用 100 mL 的 BMMY 培养基重悬, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 120 h, 每隔 24 h 添加 1% 的甲醇诱导表达并且取样检测 OD_{600} 、发酵液上清的蛋白浓度和酶活性。蛋白浓度的检测使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行定量^[15]。

利用 Ni-NTA 镍柱亲和层析和 AKTA purifier 蛋白纯化系统进行重组蛋白的分离纯化。发酵液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤处理后方可上样。上样缓冲液为 Buffer A (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 粗酶液上样到已用 Buffer A 平衡的镍柱上, 再用含不同浓度咪唑 (0–0.25 mol/L) 的上样缓冲液梯度洗脱吸附的蛋白, 收集各洗脱峰流出液, SDS-PAGE 进行通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。SDS-PAGE 的制备和电泳方法参见《蛋白技术手册》^[16], 浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%。

1.2.3 酶活测定

比色法: 根据 Kordel 等^[17]的方法, 以对硝基苯酚月桂酸酯 (*p*-NPL) 为底物进行酶活测定。酶活的定义: 一定反应条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶活国际单位。

碱滴定法: 参考国家标准 GB/T23535-2009 方法^[18], 橄榄油与 4% (W/V) 聚乙烯醇 (PVA) 以 1 : 3 (V/V) 的比例混合, 用高速匀浆机处理后得到乳白色的乳化液。以乳化后的橄榄油作为脂肪酶水解底物。每个反应体系包括 4 mL 橄榄油乳化液、5 mL 柠檬酸-磷酸盐缓冲液和 1 mL 酶液。该

反应被 95% 乙醇溶液终止, 反应释放的脂肪酸由 0.1 mol/L NaOH 中和。酶活的定义: 一定反应条件下每分钟产生 1 μmol 脂肪酸的酶量。

1.2.4 脂肪酶酶学性质研究

配制不同 pH 梯度的 50 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 2.0–8.0) 和碳酸盐缓冲液 (pH 9.0–10.0), 采用以橄榄油为底物的碱滴定法, 测定脂肪酶的最适 pH。测定 pH 稳定性时, 将酶液加入上述不同梯度的缓冲液, 并放于 4 $^{\circ}\text{C}$, 每隔 3 h 利用碱滴定法检测脂肪酶的残存活力, 以初始酶活为 100% 相对酶活。

将酶液在不同的温度条件 (20–60 $^{\circ}\text{C}$) 下反应, 利用碱滴定法检测脂肪酶的最适温度。测定温度稳定性时, 将酶液在不同温度 (20–50 $^{\circ}\text{C}$) 中保温, 每隔 0.5–1 h 利用碱滴定法检测脂肪酶的残存活力, 以初始酶活为 100% 相对酶活。

将纯化后的脂肪酶与不同碳链长度对硝基苯酚酯底物混合进行显色反应, 反应条件为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 以检测脂肪酶对底物链长的特异性。使用的对硝基苯酚酯底物根据碳链长度由短至长依次为 *p*-NPA(C2)、*p*-NPB(C4)、*p*-NPV(C5)、*p*-NPC(C8)、*p*-NPL(C12)、*p*-NPM(C14) 和 *p*-NPP(C16)。

脂肪酶酶促反应动力学参数 V_{max} 、 K_{m} 值、 k_{cat} 值的计算采用双倒数作图法 (Lineweaver-Burk plot) 和米氏方程 (Michaelis-Menten equation)。以对硝基苯酚酯 *p*-NPL 和 *p*-NPP 作为反应底物, 浓度范围是 0.1–0.9 mmol/L, 反应条件为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mmol/L 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH 7.0)。

1.2.5 脂肪酶的同源建模

利用在线软件对脂肪酶进行同源建模 (<https://swissmodel.expasy.org/>), 根据数据库中已报道的同源性较高的蛋白结构, 模拟出发脂肪酶的三级结构。计算机软件 Discovery Studio 3.1 viewer 和 PyMOL 对酶的三级结构进行观察与

分析。

1.2.6 脂肪酶的分子对接

利用软件 AutoDock Vina 进行分子对接研究,以脂肪酶蛋白为受体,底物 *p*-NPL 为配体构建分子对接系统,分析突变前后的脂肪酶分子构象的变化对脂肪酶催化活性的影响。对接参数设置为:配体可旋转键 12 个;将 ATL 口袋区域设为格子中心;格子大小设置为 X, Y, Z: 62, 43, 43;晶格的中心 (Center) 坐标设为(-21.5, 18.1, 82.9),其他参数为系统默认。

2 结果与分析

2.1 理性设计确定 ATL 突变位点

2.1.1 ATL 的氨基酸序列与模拟三维结构分析

已有研究表明,来自黑曲霉 *A. niger* NICM 1207 的酸性脂肪酶 ANL 在固态发酵和液态发酵条件下脂肪酶酶活分别为 630 U/g (固态底物) 和 18 U/mL^[5],纯化后的比活力为 1 373.13 U/mg^[19],酶活力远高于 ATL 已报道的数值 (24 U/mg)。ANL 最适 pH 和温度分别为 2.5 和 45–50 °C,且在 pH 2.5–9.0 范围内稳定性较好^[5]。因此,本研究将以黑曲霉脂肪酶 ANL 为参考依据,对土曲霉脂肪酶 ATL 进行理性改造。ATL 与 ANL (GenBank Accession No. XP_001397501.1) 的氨基酸序列一致性为 53.05% (图 1A)。鉴于还未有报道 ANL 和 ATL 的蛋白三维结构,需利用在线工具模拟获得这两个蛋白的三维模拟结构。将 ATL 和 ANL 分别进行同源搜索比对,发现这两种脂肪酶预测的结构与来自疏棉状嗜热丝孢菌 *Thermomyces lanuginosus* 脂肪酶 TLL (PDB 登录号 1DT5) 相似性最高,分别为 51.7% 和 50.37%,因此 1DT5 可作为模板结构对 ATL 进行同源建模。由于 1DT5 是闭盖结构,无法进行底物与蛋白的分子对接,结合相似度较高的米黑根毛霉 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶 RML 的开盖结构 (PDB 登录号 4TGL) 信

息模拟 ATL 的开盖结构 (图 1B)。

2.1.2 ATL 突变位点的确定

由于 ATL 在氨基酸序列和三维模拟结构上都与 ANL 拥有较高的相似度,而且 ANL 具有较高的比活,因此通过参照 ANL 的氨基酸序列对 ATL 的催化活性区域的部分位点进行选择性突变设计。如图 1A 所示,参考 ANL 的盖子区域 (⁹²STIKNWIADLDFI¹⁰⁴) 对 ATL 的盖子区域 (⁹²RSPANWIANLDFI¹⁰⁴) 进行改造,利用全质粒 PCR 的方法,将 ATL 的盖子区域前 4 个氨基酸替换为 Ser-Thr-Ile-Lys,得到突变酶 ATLLid。ANL 含有两个底物结合口袋域 (Binding pocket 1 domain 和 Binding pocket 2 domain)。在 Binding pocket 1 domain 中,ATL 仅在 Val218 位点上不同于 ANL 中的相应位点 Phe219。将 ATL 中的 Val218 替换成 Phe,得到突变酶 ATLV218F。在 Binding pocket 2 domain 中,将 ATL 氨基酸区段 ²⁶⁵HSWYFGDISECQ²⁷⁶ 替换为 ANL 中的 ²⁶⁶HLWYFFAISECLL²⁷⁸ 得到突变酶 ATLBP2。具体突变位点分布如图 1B 所示。

2.1.3 ATL 第 218 位点与 ANL 第 219 位点保守性分析

分别对 ANL 的 Phe219 和 ATL 的 Val218 的氨基酸保守性进行分析 (<http://gremlin.bakerlab.org/submit.php>)。结果表明 (图 2),ANL 在 219 位点的保守性排序依次为亮氨酸 Leu(L)、色氨酸 Trp(W)、苯丙氨酸 Phe(F) 和甲硫氨酸 Met(M),均为疏水性氨基酸。但也有较少情况下,该位点可能为天冬氨酸 Asp(D) 和谷氨酰胺 Asn(Q)。ATL 在相应 218 位点的保守性同样为 Leu(L)、Trp(W)、Phe(F) 和 Met(M)。此外,将 ATL 序列提交在线比对软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>),分析同源性较高的前 100 个序列的保守性,该位点还可能为丙氨酸 Ala(A)、异亮氨酸 Ile(I)。考虑到 L 与

I 性质相仿, 选择其一作为突变点即可。综上, 选择在 ATL 的第 218 位点除构建 ATLV218F 外继续构建 5 种突变酶: ATLV218W、ATLV218L、ATLV218D、ATLV218M 和 ATLV218A。

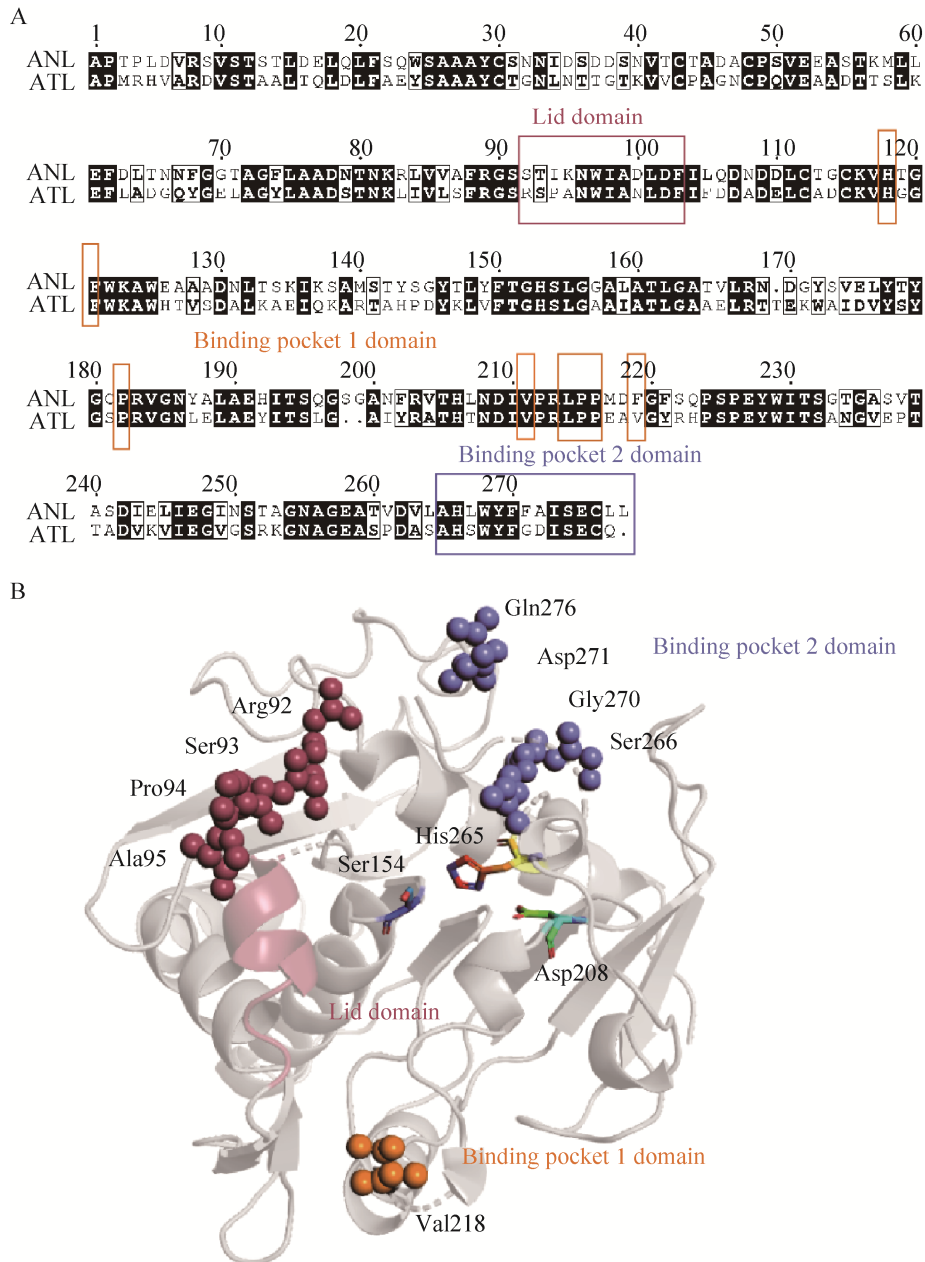


图 1 氨基酸序列与三维结构分析 (A: ANL 和 ATL 的氨基酸序列比对; B: ATL 三维结构模拟图)

Fig. 1 Analysis of amino acid sequence and three-dimensional structure. (A) Alignment of amino acid sequences of ANL and ATL. The “Lid domain” is indicated by red box; The “Binding pocket 1 domain” is indicated by orange box and the “Binding pocket 2 domain” is indicated by purple box. (B) Simulated three-dimensional structures of ATL. “Ser154-Asp208-His265” is the catalytic triad of ATL. The mutant sites located in the Lid domain and substrate binding pockets are highlighted by red, orange and purple, respectively.

2.2 重组菌株的诱导表达及分离纯化

将表达野生型脂肪酶的菌株 GS115/pPIC9K-ATL 与 8 株表达突变酶的菌株 GS115/pPIC9K-ATLLid、GS115/pPIC9K-ATLV218F、GS115/pPIC9K-ATLV218W、GS115/pPIC9K-ATLV218L、GS115/pPIC9K-ATLV218D、GS115/pPIC9K-ATLV218M、GS115/pPIC9K-ATLV218A 和 GS115/pPIC9K-

ATLBP2 进行摇瓶发酵。设置 3 个平行，定时取样，检测发酵过程中菌体的生长情况、胞外总蛋白分泌情况和上清液中酶活的变化。如图 3 所示，当甲醇诱导发酵至 96 h 时，以 *p*-NPL 为底物，突变菌株 GS115/pPIC9K-ATLLid 和 GS115/pPIC9K-ATLV218W 在 pH 7.0、40 °C 条件下的酶活分别达到 0.075 U/mL 和 0.141 U/mL，较出发菌株 GS115/

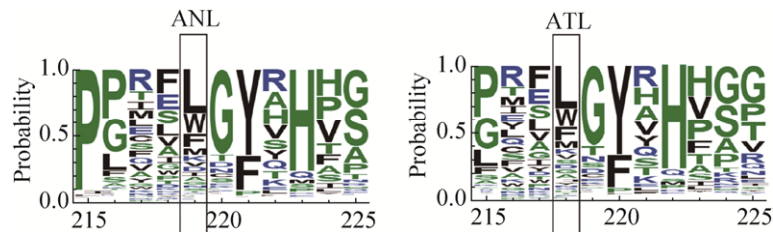


图 2 ANL Phe219 和 ATL Val218 的氨基酸保守性分析

Fig. 2 Conservation analysis of the residues Phe219 and Val218 in ANL and ATL, indicated by box, respectively.

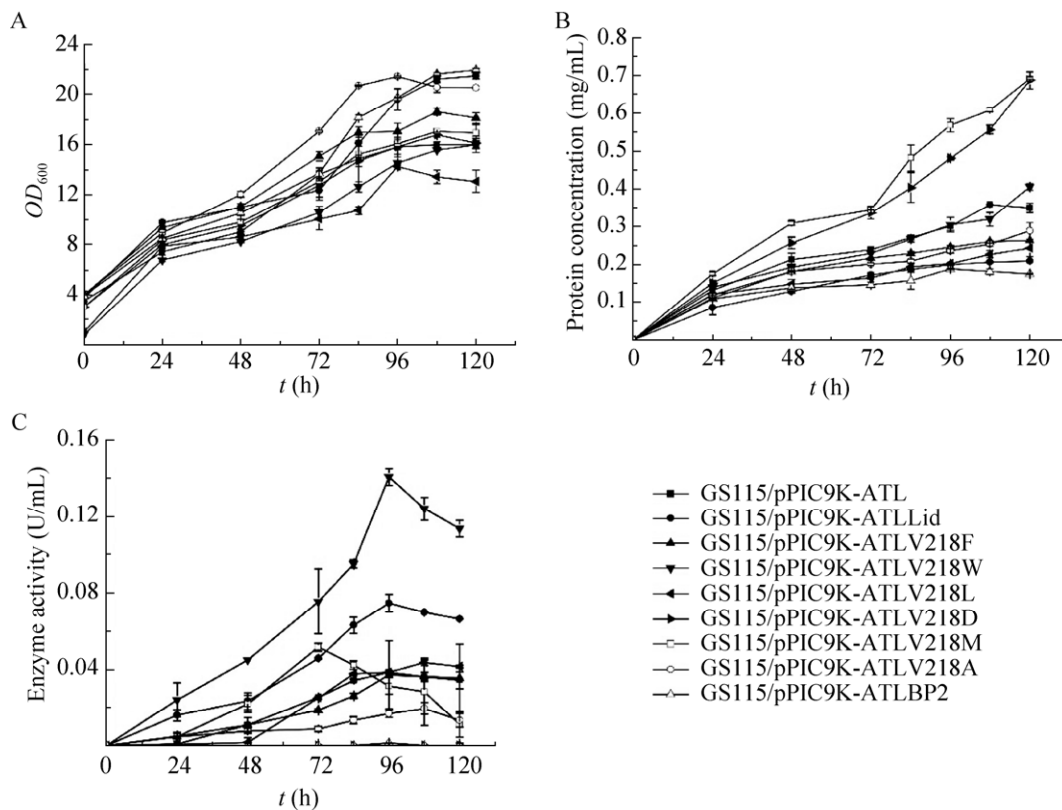


图 3 突变菌株的摇瓶发酵曲线 (A: 菌体浓度 OD_{600} ; B: 蛋白浓度; C: 酶活)

Fig. 3 Shake flask fermentation curves of mutant strains. (A) Growth curves. (B) The total protein concentration in the culture supernatant. (C) Extracellular enzyme activity in the culture supernatant. The legends of these figures (A–C) were marked in the lower right corner. Error bars indicated the standard deviation of three biological replicates.

pPIC9K-ATL 的酶活分别提高了 1.95 倍和 3.66 倍。将发酵 96 h 时收集的发酵上清液进行蛋白纯化,得到纯化的蛋白,并通过 SDS-PAGE 检测(图 4)。突变酶与野生型酶在蛋白分子量大小上没有显著区别,各样品均呈现约 44 kDa 大小的条带(黑色箭头所示)。将纯化后的蛋白制备成约 0.80 mg/mL 蛋白浓度的酶液后,以 *p*-NPL 为底物,在 pH 7.0、40 °C 条件下,分别检测突变酶和野生型酶的酶活。结果表明,ATLLid 和 ATLV218W 对 *p*-NPL 的水解活性与野生型相比显著提高,比酶活分别为 0.77 U/mg 和 1.32 U/mg,分别为野生型 ATL 活力(0.34 U/mg) 2.26 倍和 3.38 倍(图 5)。因此,将对 ATLLid 和 ATLV218W 进行酶学性质的测定和分析突变位点对蛋白催化活力影响的机制。

2.3 突变酶和野生型酶的酶学性质

2.3.1 最适 pH 及 pH 稳定性

如图 6 所示,突变酶 ATLLid 和 ATLV218W 与野生型酶 ATL 的最适 pH 均为 5.0,当 pH 为 2.0 时酶迅速失活,酶活力几乎为 0。在碱性环境中,当 pH 高于 7.0,酶活力明显下降,活力低于 30%。可见脂肪酶起水解活性作用的 pH 范围较窄,一般在 pH 4.5–6.0 之间。如图 6 所示,在 pH 4.0–8.0 范围内 ATLLid、ATLV218W 与 ATL 均具有较好的稳定性,残余活力保持在 90% 以上。当在 pH 3.0 缓冲液中放置 24 h 后,ATLLid、ATLV218W 和 ATL 分别残留约 78.26%、76.19% 和 72.19% 的相对酶活,而在 pH 2.0 时,分别残留 45.07%、42.40% 和 33.86% 的相对酶活。可见,ATL 在毕赤酵母中重组表达后并没有改变其耐酸的酶学特性^[7],且突变酶 ATLLid 和 ATLV218W 也同样具有良好的耐酸特性。

2.3.2 最适温度及温度稳定性

如图 7A 所示,突变酶 ATLLid 和 ATLV218W 的最适温度为 35 °C,而原始酶 ATL 则在 40 °C 时活性最高。当温度上升至 40 °C,ATLLid 酶活

迅速下降,仅保留 52.53% 左右,ATLV218W 则仍保留 88.46% 的酶活;当温度高于 40 °C 时,3 种蛋白的酶活均迅速下降,并在 60 °C 完全失活;当温度降为 20 °C,ATLLid 和 ATLV218W 分别保留 69.62% 和 76.67% 的活力,而 ATL 仅保留 18.69% 的活力。由图 7 可见,在 20 °C 温浴 6.5 h 后,ATLLid、ATLV218W 和 ATL 分别保留了 74.79%、84.51% 和 85.01% 的残存活力;在 30 °C 温浴 6.5 h 后,分别测得 55.70%、55.84% 和 68.87% 的相对酶活;在 40 °C 温浴 6.5 h 后,分别测得

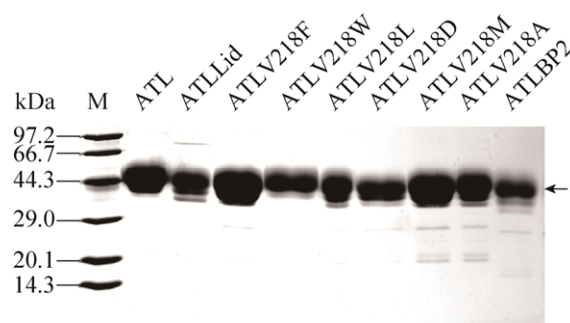


图 4 野生型脂肪酶 ATL 和突变型脂肪酶的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the parent ATL and the mutants.

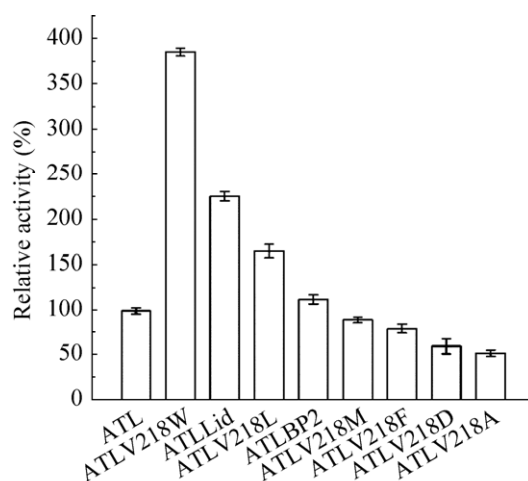


图 5 野生型脂肪酶与突变型脂肪酶的水解活性对比
Fig. 5 The relative activities of the parent ATL and the mutants on *p*-NPL. Enzyme activity of ATL is taken as 100%.

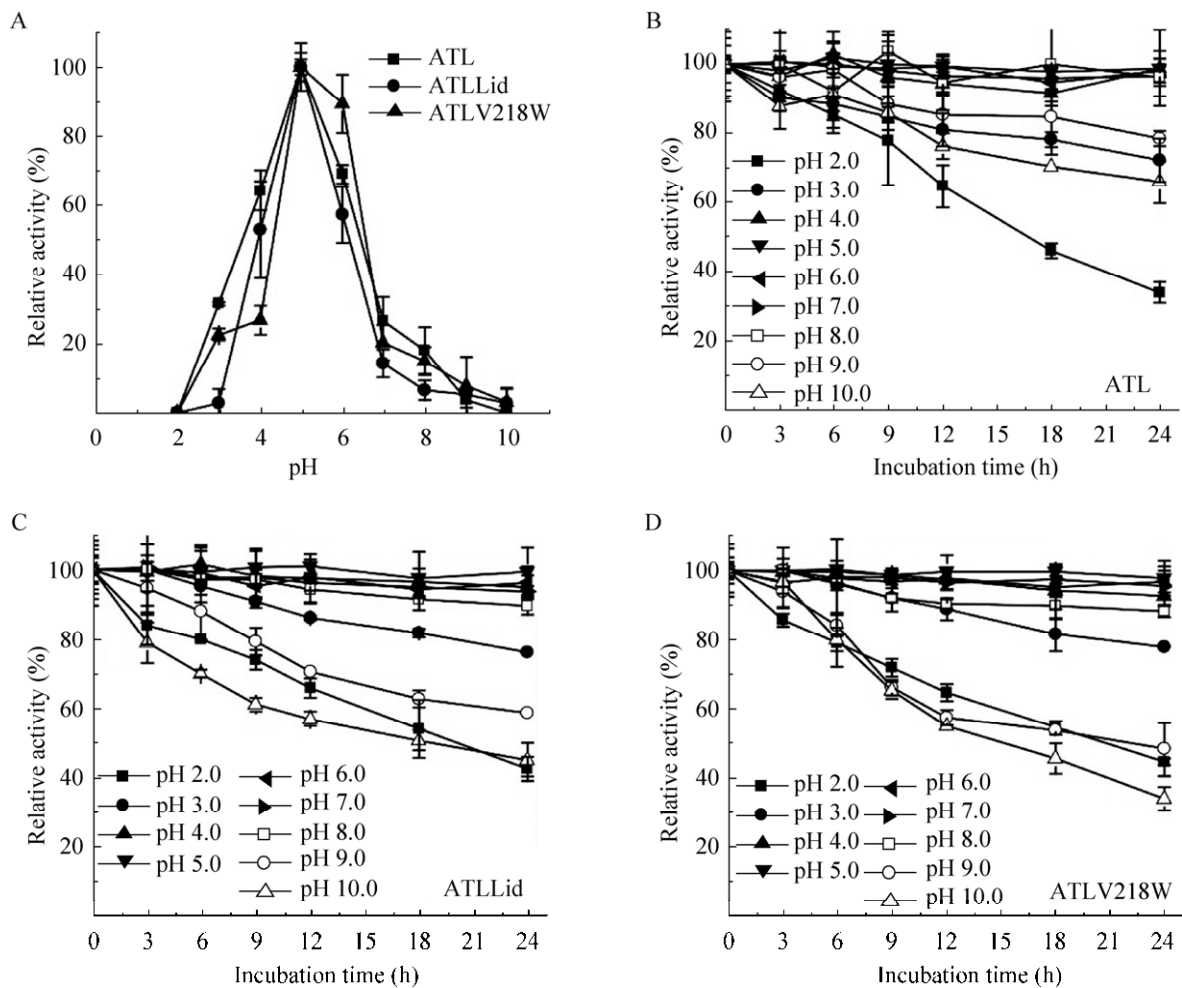


图 6 pH 对脂肪酶活力和稳定性的影响

Fig. 6 Effect of pH on the activity and stability of ATLLid, ATLV218W and ATL. (A): The optimal pH. The activity was determined under the conditions at pH 2.0–10.0 and 40 °C, using olive oil as substrate. The pH stability of ATL (B), ATLLid (C) and ATLV218W (D) were determined at 35 °C and pH 5.0 after being incubated in pH 2.0–8.0 citrate-phosphate buffer and pH 9.0–10.0 carbonate buffer for 24 h. Error bars indicate the standard deviation of three biological replicates.

36.04%、40.85%和 60.28%的相对酶活;而在 50 °C 温浴,酶活性均迅速下降,温浴 1 h 后仅分别剩余 6.77%、10.87%和 11.69%的相对酶活。可见,突变使得 ATL 的最适温度向低温 (35 °C) 略微偏移,对温度的稳定性也有所降低(ATLLid < ATLV218W < ATL)。

2.3.3 底物特异性

对酶活较高的突变酶 ATLLid 和 ATLV218W 进行了底物碳链长度特异性研究,并与野生型酶 ATL

进行对比。如图 8 所示,突变酶与野生型酶均对 12 个碳的对硝基苯酚月桂酸酯 *p*-NPL 特异性最高。然而,ATLLid 对 C14-C16 的相对酶活显著高于 ATLV218W 和 ATL,说明 ATLLid 提高了对长链脂肪酸的底物特异性。该结果表明,ATL 盖子区域改造后可识别含长链脂肪酸的底物并使其更好地结合到活性中心。可见,脂肪酶的盖子区域部分位点的改变会对酶的底物特异性产生影响,正如 Santarossa 等^[20]将莓实假单胞菌 *Pseudomonas fragi* 脂肪酶的盖子区域的

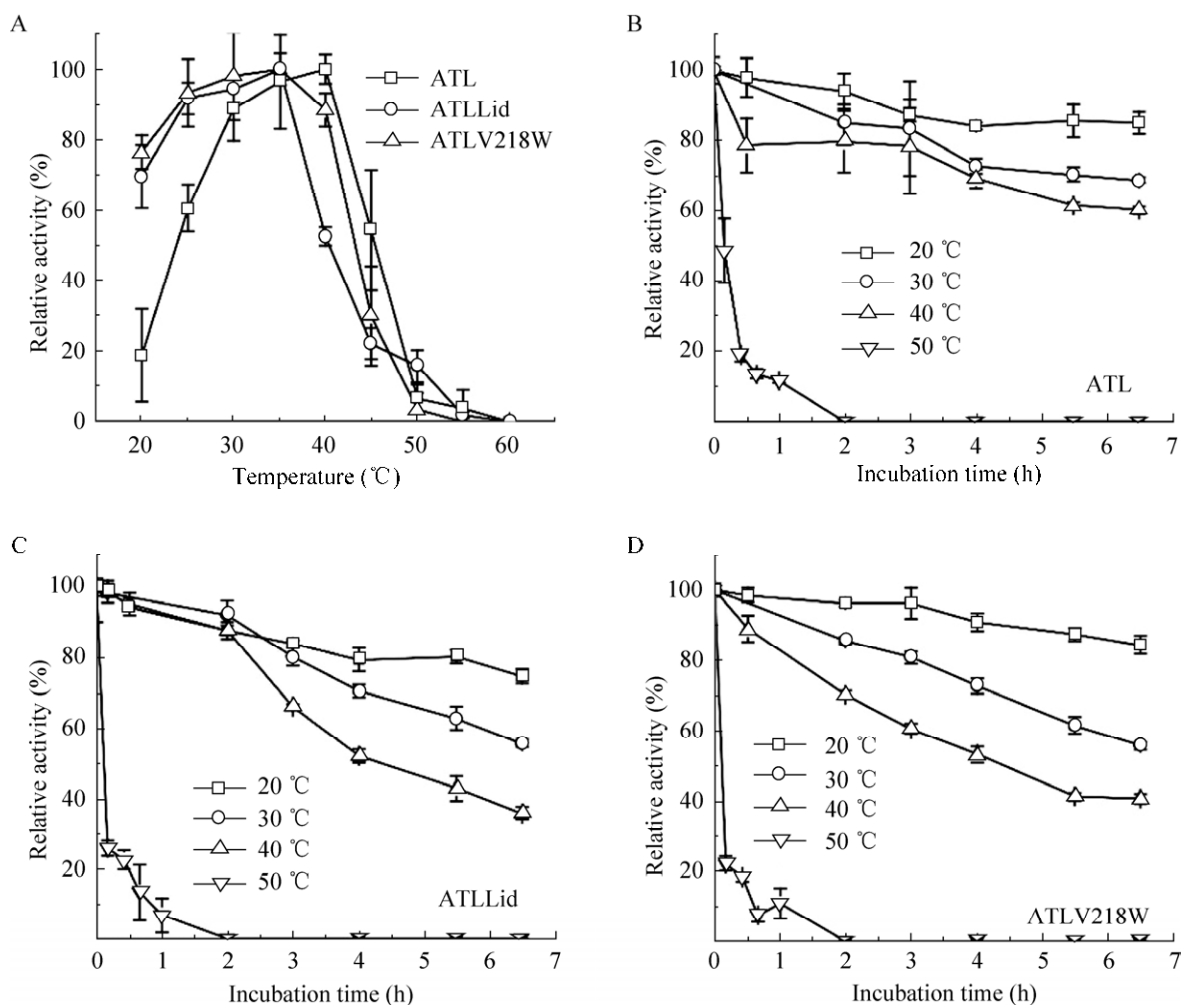


图7 温度对脂肪酶活力和稳定性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the activity and stability of ATLLid, ATLV218W and ATL. (A) The optimal temperature. The activity was determined under conditions at 20–60 °C and pH 5.0. The temperature stability of ATL (B), ATLLid (C) and ATLV218W (D) were determined at 35 °C and pH 5.0 after incubating for 6.5 h at temperatures 20–50 °C. Error bars indicate the standard deviation of three biological replicates.

Thr137 和 Thr138 分别突变为 Val 和 Asp 后显示出了对不同碳链长度底物的不同偏好性。

2.3.4 酶促反应的动力学常数

以对硝基苯酚酯 *p*-NPP 和 *p*-NPL 为底物, 测定突变酶 ATLLid 和 ATLV218W 与野生型酶 ATL 的反应动力学 (表 2)。ATLLid 对两种底物 *p*-NPL 和 *p*-NPP 的 K_m 值从原来的 0.15 mmol/L 和 0.73 mmol/L 分别提高到了 1.53 mmol/L 和 1.69 mmol/L, 说明突

变的盖子结构阻碍底物进入酶的活性中心, 导致突变酶对底物的亲和力变差, 酶反应所需的底物浓度增大。但是, 脂肪酶的 k_{cat} 值却比野生型酶分别提高了约 39.37 倍和 9.55 倍, 催化活性显著增强。由此, k_{cat}/K_m 值分别提高了 2.85 倍和 3.57 倍, 该结果表明酶的催化效率提高的主要原因是盖子构型的变化导致的酶活性中心催化能力的提高, 但随着对底物亲和力的降低, 会影响催化效率的提高程度。

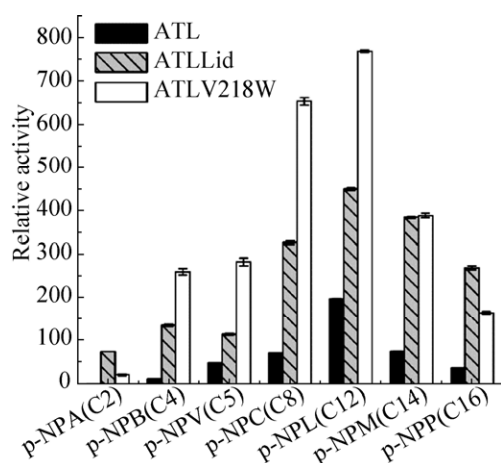


图 8 突变型脂肪酶 ATLLid、ATLV218W 和野生型脂肪酶 ATL 的底物特异性

Fig. 8 Substrate specificity of ATLLid, ATLV218W and the parent ATL utilizing *p*-NP esters with different acyl chain lengths. *p*-NPA: *p*-nitrophenyl acetate; *p*-NPB: *p*-nitrophenyl butyrate; *p*-NPV: *p*-nitrophenyl valerate; *p*-NPC: *p*-nitrophenyl caprilate; *p*-NPL: *p*-nitrophenyl laurate; *p*-NPM: *p*-nitrophenyl myristate; *p*-NPP: *p*-nitrophenyl palmitate. The relative activity of ATL on *p*-NPA was set as "1".

底物结合口袋域突变后, 脂肪酶 ATLV218W 对两种底物 *p*-NPL 和 *p*-NPP 的 K_m 值比野生型酶 ATL 分别提高了 4.33 倍和 0.95 倍, 说明将底物结合口袋域中的缬氨酸 Val 突变为色氨酸 Trp 后, 对底物的亲和力也显著降低, 酶反应需要的底物浓度变大。然而, 脂肪酶的 k_{cat} 值却比野生型酶分别提高了约 50.79 倍和 14.67 倍, 说明突变影响了酶的活性中心与底物的相互作用, 导致催化活性显著增强。由此, k_{cat}/K_m 值分别提高了 8.48 倍

和 7.01 倍, 该结果表明酶的催化效率提高的主要原因是底物结合口袋域构型变化导致的酶活性中心催化能力的提高。

综合上述两种突变酶的动力学参数的测定结果发现, 选定的突变位点虽然使得脂肪酶对底物的亲和能力降低, 但显著提高了酶的催化速度, 从而提高了脂肪酶的催化活性。

2.4 突变酶的结构分析

本研究通过对 ATL 的盖子区域和底物结合口袋域的部分位点进行定点突变, 得到两种对底物对硝基苯酚月桂酸酯 *p*-NPL 的催化活性显著提高的突变酶 ATLLid 和 ATLV218W。通过对蛋白质同源建模模拟及分子对接, 分别分析导致 ATLLid 和 ATLV218W 对底物 *p*-NPL 催化活性提高的原因。

2.4.1 突变酶 ATLLid

解折叠自由能是蛋白质折叠态和伸展态之间的吉布斯自由能差, 反映的是蛋白质解聚及解链过程中受到的氢键、范德华力、熵效应等的综合影响, 是反映蛋白质热力学稳定性的重要参数^[21]。如图 1 所示突变酶 ATLLid 的突变位点位于盖子区域的前 4 个氨基酸, 利用 FoldX^[22]预测突变结构的解折叠自由能, 得到的解折叠自由能差($\Delta\Delta G$)约为 -0.92 kcal/mol ($\Delta\Delta G = \Delta G_{mutant} - \Delta G_{wild}$, $\Delta\Delta G > 0$ 代表正效应, $\Delta\Delta G < 0$ 代表负效应^[21,23]), 说明盖子区域的突变降低了整个结构的解折叠自由能, 可能

表 2 野生型 ATL 与突变型酶 ATLLid 和 ATLV218W 动力学参数

Table 2 The kinetic parameters of ATL, ATLLid and ATLV218W

Enzyme	Substrate	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{min})$)	k_{cat} (s^{-1} , $\times 10^{-3}$)	k_{cat}/K_m ($\text{L}/(\text{s}\cdot\mu\text{mol})$, $\times 10^{-5}$)
ATL	<i>p</i> -NPL	0.15	3.85	1.90	1.30
	<i>p</i> -NPP	0.73	11.40	5.63	0.77
ATLV218W	<i>p</i> -NPL	0.80	199.48	98.40	12.33
	<i>p</i> -NPP	1.43	178.87	88.20	6.17
ATLLid	<i>p</i> -NPL	1.53	155.50	76.72	5.01
	<i>p</i> -NPP	1.69	120.41	59.41	3.52

在一定程度上提高了 ATL 盖子区域的柔性,进而使得底物更易进入活性中心。

蛋白的亲疏水相互作用是维持蛋白质空间构象的重要因素,通常根据蛋白质的总平均亲水性 GRAVY 值 (Grand average of hydropathy) 来预测疏水性的变化^[24]。GRAVY 值是指序列中所有氨基酸亲水值的总和与氨基酸数量的比值,负值越大表示亲水性越好,正值越大表示疏水性越强。通过 ProtParam 工具 (<http://web.expasy.org/protparam/>)分析结果显示,出发酶 ATL 的盖子序列的 GRAVY 为-0.300,而突变酶 ATLLid 盖子序列的 GRAVY 为 0.050。这说明突变后的 ATLLid 盖子的疏水性增加,这可能导致盖子与疏水性底物的亲和力增加,底物进入活性中心的阻力减小,从而催化效率提高。

利用 PyMOL 中的 Mutagenesis 模块来构建突变酶 ATLLid 的模拟结构,并分别将 ATL 和 ATLLid 的开盖模拟结构与 *p*-NPL 进行分子对接。如图 9 所示,*p*-NPL 所结合的狭长凹陷区域为底物结合口袋区域,红色代表催化活性中心,砖红色为盖子区域。突变酶 ATLLid 的底物结合口袋 (图 9A) 与野生型 (图 9B) 相比,位于对硝基苯所在方向的口袋区域显著增大,

与野生型相比空间位阻减少 (黄色箭头所示),使对硝基苯酚酯类底物更好地进入口袋并与活性中心结合,从而提高 ATLLid 对该类底物的偏好性。另外,ATLLid 盖子的疏水性增加,能够更好地稳定底物中疏水性长链脂肪酸基团,因此 ATLLid 对长链底物如 *p*-NPL,催化活力更高。分子对接为 ATLLid 的底物特异性研究结果 (图 8) 提供了有力的证据。

2.4.2 突变酶 ATLV218W

如图 10A 所示,Val218 处于 Binding pocket 1 domain,位于 β 转角,介于 α 螺旋与无规卷曲之间,其 N 端通过 α 螺旋与催化三联体中的 Asp208 相连。使用 PyMOL 中的 Mutagenesis 模块进行虚拟突变,将 218 位点的 V 突变为 W 后,该 β 转角的二面角构型发生变化,使得该区域的空间构象发生改变,同时影响到 Asp208 的空间位置。如图 10 所示,突变后,ATLV218W 中 Asp208 与 His265 的间距由 3.2 Å (图 10A) 缩短至 2.8 Å (图 10B),从而影响催化三联体的整体构象。由于催化三联体的空间位置发生极小的改变都将会影响酶的催化活性,在本研究中 ATLV218W 对于底物 *p*-NPL 的 k_{cat} 相比野生型提高了 49.9 倍。

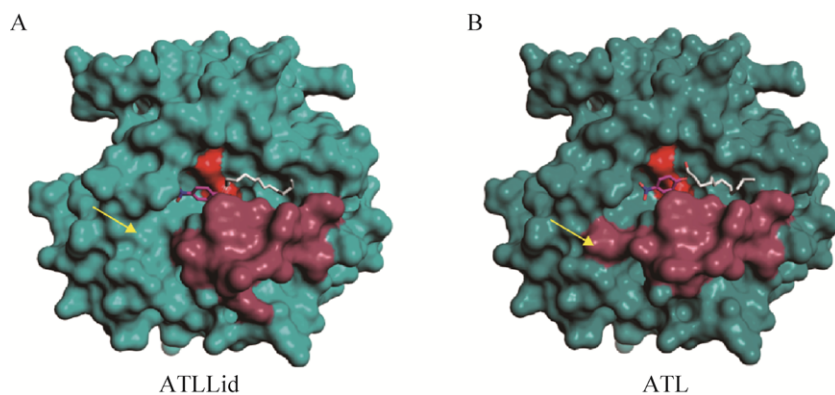


图 9 ATLLid 与 ATL 底物对接三维模拟图

Fig. 9 Simulated three-dimensional structures of ATLLid and ATL docked with *p*-NPL. (A) ATLLid. (B) ATL.

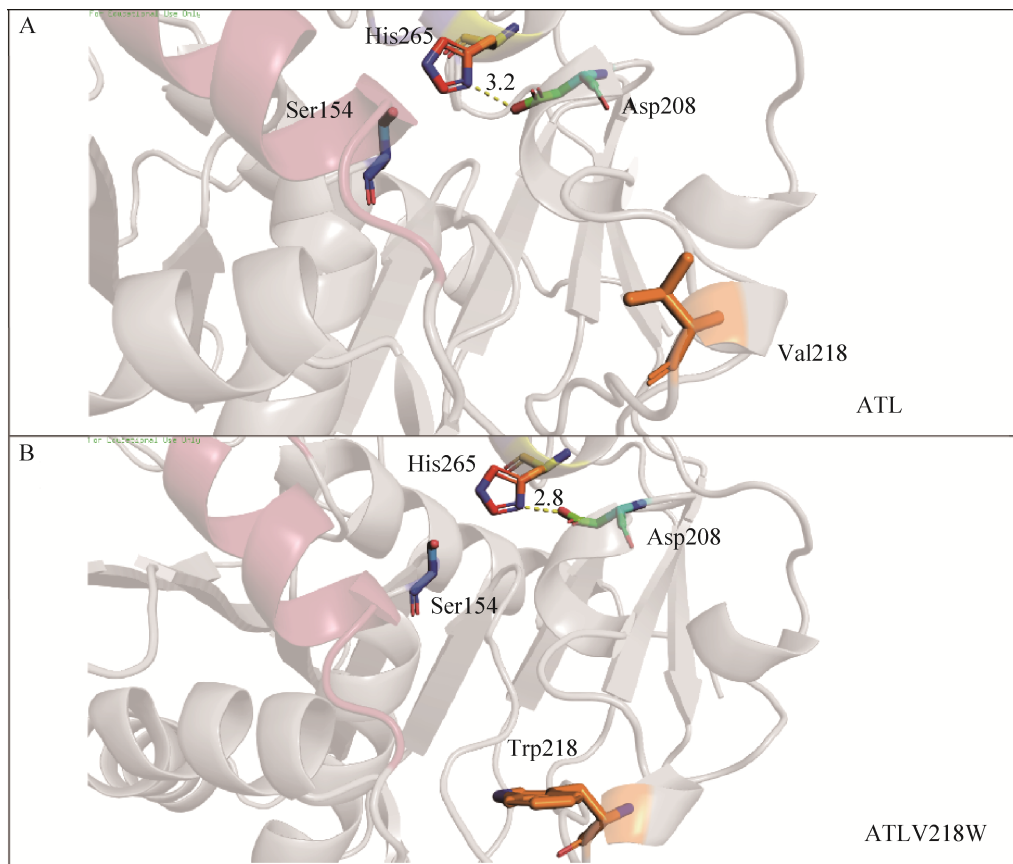


图 10 ATL 的突变点 Val218 的三维结构模拟图

Fig. 10 Simulated three-dimensional structure of ATL and ATL218W. (A) ATL. (B) ATL218W.

3 结论

综上所述,本研究采用理性设计的方法,对来自 *A. terreus* 的脂肪酶 ATL 的盖子区域和底物结合口袋域中的位点进行定点突变,得到了对对硝基苯酚酯类底物催化活性显著提高的两种突变酶 ATLLid 和 ATL218W。利用同源建模模拟及分子对接等手段分析得出,ATLLid 盖子区域的突变可使盖子柔性增强、疏水性提高和底物结合口袋变大,使得底物更易进入催化活性中心,提高对长链底物的催化活力。ATL218W 底物结合口袋域的突变则影响了催化三联体中的 Asp208 的空间位置,进而影响酶的催化活性。因此,本研究的后续工作将在此研究工作基础上对盖子区域和底物结合口袋域进行饱和突变或组合突变,以

期获得催化活性更高的脂肪酶。

REFERENCES

- [1] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(8): 627–662.
- [2] Ramani K, Chockalingam E, Sekaran G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(5): 531–535.
- [3] Yan LJ, Xie ZR, Zhao CL, et al. A research on screening and fermentation conditions of thermostable lipase strain NJY-I-3. *Food Sci Technol*, 2010, 35(3): 11–15 (in Chinese). 闫丽娟, 谢振荣, 赵春雷, 等. 耐高温酸性脂肪酶菌株 NJY-1-3 的选育及发酵条件的研究. *食品科技*, 2010, 35(3): 11–15.
- [4] Wang HY, Li FH, Gao XH. Advances in lipase research and its application in animal feed. *Feed Ind*, 2007, 28(4): 14–17 (in Chinese).

- 王海燕, 李富华, 高秀华. 脂肪酶的研究进展及其在饲料中的应用. 饲料工业, 2007, 28(4): 14–17.
- [5] Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Proc Biochem, 2002, 38(5): 715–721.
- [6] Zhou J, Chen WW, Jia ZB, et al. Purification and characterization of lipase produced by *Aspergillus oryzae* CJLU-31 isolated from waste cooking oily soil. Am J Food Technol, 2012, 7(10): 596–608.
- [7] Shi H, Meng Y, Yang M, et al. Purification and characterization of a hydrolysis-resistant lipase from *Aspergillus terreus*. Biotechnol Appl Biochem, 2014, 61(2): 165–174.
- [8] Mahadik ND, Bastawde KB, Puntambekar US, et al. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. Proc Biochem, 2004, 39(12): 2031–2034.
- [9] Liu G, Hu SQ, Li L, et al. Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent-tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. Lipids, 2015, 50(11): 1155–1163.
- [10] Mahadik ND, Gokhale DV, Bastawde KB, et al. Process for the preparation of acidic lipase: US, 6534303B2. 2003-03-18.
- [11] Davidson JG, Medhekar R, Moore J, et al. Protease composition and method for treating a digestive disorder: US, 7067124B2. 2006-06-27.
- [12] Gao B, Xu T, Lin JP, et al. Improving the catalytic activity of lipase LipK107 from *Proteus* sp. by site-directed mutagenesis in the lid domain based on computer simulation. J Mol Catal B: Enzym, 2011, 68(3/4): 286–291.
- [13] Skjøt M, de Maria L, Chatterjee R, et al. Understanding the plasticity of the α/β hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties. ChemBiochem, 2009, 10(3): 520–527.
- [14] Mosbah H, Sayari A, Horchani H, et al. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: a study with emulsified substrate. Protein Expr Purif, 2007, 55(1): 31–39.
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [16] Wang JZ, Fan M. Manual of protein technique. Beijing: Science Press, 2000 (in Chinese). 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [17] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, et al. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. J Bacteriol, 1991, 173(15): 4836–4841.
- [18] China Food Fermentation Industry Research Institute. Novozymes (China) Biotechnology Co., Ltd. GB/T 23535-2009 Lipase preparations. People's Republic of China State Administration of quality supervision, inspection and quarantine, China National Standardization Management Committee (in Chinese). 中国食品发酵工业研究院. 诺维信(中国)生物技术有限公司. GB/T 23535-2009 脂肪酶制剂. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局中国国家标准化管理委员会; 2009.
- [19] Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale DV. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. Bioresour Technol, 2009, 100(3): 1486–1490.
- [20] Santarossa G, Lafranconi PG, Alquati C, et al. Mutations in the "lid" region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase. FEBS Lett, 2005, 579(11): 2383–2386.
- [21] Benedix A, Becker CM, de Groot BL, et al. Predicting free energy changes using structural ensembles. Nat Methods, 2009, 6(1): 3–4.
- [22] Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, et al. The FoldX web server: an online force field. Nucleic Acids Res, 2005, 33(S2): W382–W388.
- [23] Tian J. Improvement of the protein thermal stability by the computer aided molecular design[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese). 田健. 计算机辅助分子设计提高蛋白质热稳定性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [24] Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol, 1982, 157(1): 105–132.

(本文责编 郝丽芳)