

米根霉 α -淀粉酶热稳定性的理性设计

杨倩, 汤斌, 李松

安徽工程大学 生物与化学工程学院, 安徽 芜湖 241000

杨倩, 汤斌, 李松. 米根霉 α -淀粉酶热稳定性的理性设计. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1117-1127.

Yang Q, Tang B, Li S. Improving the thermostability of α -amylase from *Rhizopus oryzae* by rational design. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1117-1127.

摘要: 真菌 α -淀粉酶被广泛应用于麦芽糖浆生产工业,但其热稳定性普遍较差,在制糖工艺中增加了由于酶活力损失而引起的追加生产成本。在充分研究了热稳定性对于真菌 α -淀粉酶应用于工业生产的重要性的基础上,为提高米根霉 α -淀粉酶(ROAmy)的热稳定性,基于酶蛋白B-factor分析和分子动力学模拟,利用重叠PCR技术分别对ROAmy中的3个氨基酸残基G128、K269和G393进行了单点突变及组合突变。结果表明,所获得的7个突变体均比原酶具有更好的热稳定性,其中效果最好的为组合突变体G128L/K269L/G393P,其在55℃下的热失活半衰期($t_{1/2}$)约为原酶的5.63倍。同时,该突变体的最适温度由50℃提高到了65℃,最大反应速率(V_{\max})和催化效率(k_{cat}/K_m)分别提高了65.38%和99.86%。通过蛋白结构功能比较分析,发现氢键数目的增多或脯氨酸在特殊位置中的引入可能是突变体热稳定性得到提高的主要因素。

关键词: 真菌 α -淀粉酶, B-factor, 定点突变, 热稳定性, 分子动力学模拟

Improving the thermostability of α -amylase from *Rhizopus oryzae* by rational design

Qian Yang, Bin Tang, and Song Li

School of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China

Abstract: Fungal α -amylases are widely used in the production of maltose syrup, while additional production costs may be required in the syrup production process due to the loss of enzyme activity, because of the poor thermostability exhibited in this type of enzyme. After deeply studying the importance of thermostability of fungal α -amylases applied in industrial production, with attempt to improve the thermostability of *Rhizopus oryzae* α -amylase (ROAmy), single-point mutations and combined mutations that based on analysis of B-factor values and molecular dynamics simulations were carried out for amino acid residues G128, K269 and G393 of ROAmy by overlapping PCR. The results showed that all the 7 mutants obtained presented better thermostability than the wild-type enzyme, and the best mutant was G128L/K269L/G393P which showed a 5.63-fold increase in half-life at 55 °C compared with the wild-type enzyme. Meanwhile, its optimum temperature increased

Received: December 12, 2017; **Accepted:** January 25, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31401630), Natural Science Foundation for the Youth of Anhui Province (No. 1708085QC63).

Corresponding author: Bin Tang. Tel: +86-553-2871254; E-mail: tangbin@ahpu.edu.cn

国家自然科学基金青年项目 (No. 31401630), 安徽省自然科学基金青年项目 (No. 1708085QC63) 资助。

from 50 °C to 65 °C, the maximum reaction rate (V_{max}) and catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) increased by 65.38% and 99.86%. By comparing and analyzing the protein structure and function between the mutants and the wild-type enzyme, it was found that the increase of the number of hydrogen bonds or the introduction of proline in special position may be the main reasons for the improved thermostability that found in the mutants.

Keywords: fungal α -amylase, B-factor, site-directed mutagenesis, thermostability, molecular dynamics simulation

真菌 α -淀粉酶 (EC 3.2.1.1) 主要指一类真核微生物来源的 α -淀粉酶, 其不仅能够水解淀粉内部的 α -1,4-糖苷键, 也能水解麦芽三糖, 终产物中的主要物质为麦芽糖、部分寡糖以及少量的葡萄糖^[1-2]。由于真菌 α -淀粉酶具有特殊的高麦芽糖生成能力, 使其在很多工业上的应用逐年增加, 例如高麦芽糖浆、烘焙和酿造工业等^[3-4]。目前大部分商用真菌 α -淀粉酶在麦芽糖浆生产中的最适作用温度在 50–55 °C 之间^[5], 在该温度条件下, 糖液在长时间的处理过程中容易被嗜温微生物污染而变质^[6], 而当反应温度超过 60 °C 时酶的催化效率和活力单位会急剧下降。因此, 提高真菌 α -淀粉酶的耐热性将有助于改善制糖工艺以减少糖液感染嗜温细菌的几率并降低生产成本^[7]。

由于蛋白质热稳定性的影响因素众多, 目前还没有一种通用的蛋白质理性设计方法。随着生物信息学的快速发展, 通常在对蛋白质结构进行分析的基础上利用 B-factor、脯氨酸效应 (Proline theory)、折叠自由能或是同源比对等方法设计突变体以获得热稳定性提高的突变株。其中, B-factor (或 B-value) 表示蛋白质晶体结构中原子的位移参数, 可反映蛋白质分子在晶体中的构象, 某一残基的 B-factor 越高, 其相应部位的构象就越不稳定或柔性越强^[8-9]。实验表明对蛋白质结构中 B-factor 较高的残基进行突变, 部分突变体的温度稳定性得到了明显的提高^[10-11]。同时, 可以对 B-factor 较高的氨基酸进行饱和突变以获得更好的实验结果^[12-13]。然而这种方法需要构建并筛选大量的突变体, 将耗费大量的人力和时间。计算机辅助分子动力学模拟可在原子或分子水平上描述蛋白质结构中分子的运动过程, 这种模拟技术

已被广泛应用于蛋白质热稳定性的定向改造^[14]。因此, 在获取 B-factor 的基础上再根据计算机辅助分子动力学模拟结果进一步理性设计并快速选择合理的突变位点, 是一种较为便捷、有效的蛋白质改造方法, 例如: Huang 等利用 B-factor 和折叠自由能计算方法, 对一种转氨酶的柔性区域进行了突变, 其中效果最好的突变体 T130M/E133F 在 40 °C 下的热失活半衰期 ($t_{1/2}$) 是原酶的 3.3 倍^[15]; Li 等利用多序列比对和 PoPMuSiC 算法辅助设计, 构建了 7 个地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* α -淀粉酶突变体, 其中最稳定的突变体在 95 °C 下的 $t_{1/2}$ 是原酶的 9 倍^[16]。

为提高米根霉 α -淀粉酶的热稳定性并揭示与耐热性相关的关键氨基酸结构, 本研究基于 B-factor 和分子动力学模拟辅助设计, 利用重叠 PCR 技术对 3 个潜在的关键氨基酸残基进行了单位点突变和组合突变, 同时对各突变体的理化性质进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒

含有米根霉 α -淀粉酶基因 (*ROAmy*) 的重组质粒 pUC57-*ROAmy* 为本实验室在前期研究工作中构建。其中, 基因 *ROAmy* (GenBank 登录号 HM234170) 克隆自菌株米根霉 *Rhizopus oryzae* F0071。菌株大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和克鲁维乳酸酵母 *Kluyveromyces lactis* GG799 以及质粒 pUC57 和 pKLAC1 为本实验室保藏。

1.1.2 工具酶、试剂盒及引物

实验中所使用的各种限制性核酸内切酶、

DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶以及质粒抽提、PCR 产物纯化和胶回收等试剂盒分别购自宝生物工程 (大连) 有限公司或生工生物工程 (上海) 股份有限公司。PCR 引物由生工生物 (上海) 股份有限公司合成, 具体信息如表 1 所示。

1.1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 其中固体 LB 培养基添加 1.5% 琼脂粉。YEPD 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 胰蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 自然 pH。YEPG 培养基 (g/L): 酵母粉 10, 胰蛋白胨 20, 半乳糖 20, 自然 pH。YCBA 培养基 (g/L): 酵母碳基 10, 乙酰胺 0.3, 琼脂粉 15, 自然 pH。活性筛选培养基 (g/L): 酵母粉 10, 胰蛋白胨 20, 葡萄糖 20, 可溶性淀粉 2, 自然 pH。

1.1.4 试剂

酵母碳基 (YCB) 为英国 OXOID 公司产品, 其他试剂均为国产或进口的生化或分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

以米曲霉 α -淀粉酶晶体结构 (PDB: 2taa) 为模板, 利用软件 Swiss Model Server (<https://swissmodel.expasy.org/>) 建立米根霉 α -淀粉酶 (ROAmy) 及其突变体的三维 (3-D) 结构模型。所构建模型的质量进一步利用 Profile-3D、拉曼图和软件

Molprobitry (<http://molprobitry.biochem.duke.edu/>) 进行评估。同时, 通过 B-FITTER 软件计算 ROAmy 中所有氨基酸的 B-factor^[17]。利用生物学软件 Discovery studio 2.5 进行分子对接和分子动力学模拟。以 ROAmy 及其突变体为受体, 以从 NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 PubChem Compound 数据库中获得的麦芽三糖分子 (3D conformer, PubChem CID: 192826) 为配体进行分子对接。将对接好的蛋白质-配体复合物导入 Discovery studio 2.5 进行分子动力学模拟, 赋予模拟体系 CHARMm 力场, 然后模拟对复合物添加溶液环境, 设置动力学模拟各项参数。在模拟结束后, 对结果进行分析并根据分子动力学计算所得的轨迹计算蛋白质-配体复合物之间的相互作用能。

1.2.2 突变体的构建和筛选

在计算机辅助分析的基础上, 利用定点突变技术构建了 7 个突变体。根据 ROAmy 成熟肽编码序列, 设计了上游引物 ROAmy-F 和下游引物 ROAmy-R, 分别引入限制性酶切位点 *Sal* I 和 *Not* I。同时根据密码子使用, 设计了引入突变位点的引物 (表 1)。扩增得到的 PCR 产物纯化后使用 *Sal* I 和 *Not* I 进行双酶切, 酶切产物纯化后与经同样双酶切的 pKLAC1 相连接并转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 将筛选得到的阳性转化子送

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
ROAmy-F	ATG <u>T</u> CGACGTGCCTGTCATCAAGCGAGCC	29
ROAmy-R	ATGCGG <u>C</u> CGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTTCCTTTTGGAAAT	44
G128L-F	GCTGGCACTCCTTCATCAGGCTTGGACTATTCTGGCTACA	40
G128L-R	TGTAGCCAGAATAGTCCAAGCCTGATGAAGGAGTGCCAGC	40
K269L-F	TTAAGTTCTGGCTTTTCTGATATTTGAATGGAAACTTTA	40
K269L-R	TAAAGTTTCCATTCAAATATCAGAAAAGCCAGAACTTAA	40
G393P-F	AACA <u>A</u> CTATGGTCAACCTTCAACAAACACAATTACTGTA	39
G393P-R	TACAGTAATTGTGTTTGTGTAAGGTTGACCATAGTTGTT	39

Underlined letters are restriction enzyme cut sites and italic letters are His-tag coding sequence.

至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。验证正确后提取重组质粒并经 *Sac* II 线性化后通过电转化法导入 *K. lactis* GG799 感受态细胞。重组酵母使用 YCBA 平板进行筛选并进行单菌落分离,将分离的单菌落分别点种至活性筛选培养基,在 30 °C 静置培养 48 h 后使用稀碘液染色,筛选淀粉水解透明圈直径较大的转化子进行摇瓶发酵。

1.2.3 重组菌的发酵及酶液纯化

接种重组酵母单菌落于 10 mL YEPD 培养基中,在 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h 后,取 1 mL 培养液接种于 50 mL YEPG 培养基中并在同等条件下继续培养 36 h。发酵结束后通过离心(8 000 r/min, 5 min)去除酵母细胞,上清液经硫酸铵盐析、金属亲和层析(HisTrap™ HP 1 mL column, GE Healthcare)、脱盐(HiTrap™ 5 mL, GE Healthcare)等步骤进行纯化,得到电泳纯的蛋白质之后将酶液进行真空冷冻干燥得到酶粉并贮存于 4 °C,使用时根据实验目的将酶粉溶解于不同 pH 值的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(0.2 mol/L)中。以牛血清蛋白为标准品,根据 Bradford 法测定蛋白质含量^[18]。利用 SDS-PAGE 检测蛋白质的纯度。

1.2.4 重组酶学性质以及动力学参数测定

酶活测定按照文献[19]所述的淀粉-碘液法测定。具体为:取 240 μL 可溶性淀粉溶液(2 g/L)与 240 μL 酶液混合,于 55 °C 下反应 10 min 后加入 120 μL HCl 溶液(0.1 mol/L)终止反应,再向体系中加入 600 μL 稀碘液(5 mmol/L I_2 和 5 mmol/L KI),混合均匀后在 580 nm 处测定吸光值以对反应液中残余淀粉进行定量。一个 α -淀粉酶活力单位(U)定义为:在上述反应条件下,每分钟消耗 1 mg 可溶性淀粉所需要的酶量。反应中所使用的酶液指将一定量的酶粉溶解于柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0)而获得的淀粉酶溶液。

最适反应温度测定:在 pH 5.0 条件下,分别在 35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C、65 °C、

70 °C 条件下测定酶活力,以最高酶活力为 100% 计算相对酶活力,以确定酶的最适反应温度。

温度稳定性测定:将酶液使用柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0)稀释至 5 U/mL 并于 55 °C 条件下保温不同时间后取出,在冰上放置 30 min 后测定残余酶活力,并以未保温的样品所测定的酶活力为 100% 计算相对酶活力,以比较酶的热稳定性。热失活半衰期($t_{1/2}$)利用公式 $t_{1/2} = \ln 2/k_d$ 计算,其中 k_d 为一级动力学常数^[20]。

最适反应 pH 测定:在 55 °C 条件下,分别在 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 的缓冲体系中测定酶活力,以最高酶活力为 100% 计算相对酶活力,确定酶的最适反应 pH。

pH 稳定性测定:将酶粉溶解于不同 pH 值的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(0.1 mol/L, pH 3.0-7.5)中并于 55 °C 下保温 10 min 后取出,在冰上放置 30 min 并使用柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0),稀释 10 倍后测定剩余酶活力,以未保温的样品测定的酶活力为 100% 计算相对酶活力以确定酶的 pH 稳定性。

米氏常数的测定:使用不同浓度的可溶性淀粉溶液(0.2-6.0 mg/mL)为底物,在标准酶活力测定条件下测定 α -淀粉酶活力,并依据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法计算酶对可溶性淀粉的米氏常数 K_m 和 V_{max} 。

1.2.5 数据分析

实验中所有数据的测定均做 3 组平行,数据以平均值或平均值 \pm 标准差(如有需要)形式呈现。标准差计算以及显著性分析(*t*-test)均利用软件 OriginPro 2015 (OriginLab Corporation) 完成。

2 结果与分析

2.1 ROAmy 的结构建模分析与突变体的设计

ROAmy 的氨基酸序列与米曲霉 α -淀粉酶

(PDB : 2taa) 的氨基酸序列相似度高达 45% , 以其为模板 , 利用 Swiss Model Server 对 ROAmy 建立 3D 结构模型经过评估后用于后续的分析。为合理、快速地选择待突变位点 , 研究中首先利用软件 B-FITTER 计算 ROAmy 中所有氨基酸的 B-factor , 其中 B-factor 值较高的前 10 个氨基酸残基如表 2 所示。

研究中选择了 B-factor 值较高的前 3 个氨基酸残基 G128、K269 和 G393 进行分析并得到这 3 个残基在蛋白质结构中的位置 (图 1) , 结构模拟表明这 3 个残基分别位于 ROAmy 中 Domain B 的无规则卷曲处、Domain A 的 $(\alpha/\beta)_8$ TIM 桶状结构的第 6 个 α -螺旋及 Domain C 处。

进一步利用 Discovery studio 2.5 软件将以上 3 个残基分别替换为其他 19 种氨基酸并进行分子动力学模拟 , 结果显示 G128L、K269L 和 G393P 的蛋白质-配体复合物之间的相互作用能最低 (表 3)。为研究各残基突变的单独作用和累积效应 , 利用重叠 PCR 技术分别获得了 3 个单突变体 (G128L、K269L 和 G393P) 以及 4 个组合突变体 (G128L/K269L、K269L/G393P、G128L/G393P 和 G128L/K269L/G393P)。

表 2 ROAmy 中 B-factor 值较高的前 10 个氨基酸残基
Table 2 Amino acids in ROAmy with top ten B-factor values

Residue name	Residue sequence number	B-factor	Ranking
Gly	393	33.31	1
Gly	128	32.77	2
Lys	269	32.67	3
Glu	90	31.04	4
Tyr	149	30.95	5
Asp	96	30.31	6
Thr	397	30.02	7
Ser	394	29.84	8
Asp	151	29.26	9
Asn	425	28.95	10

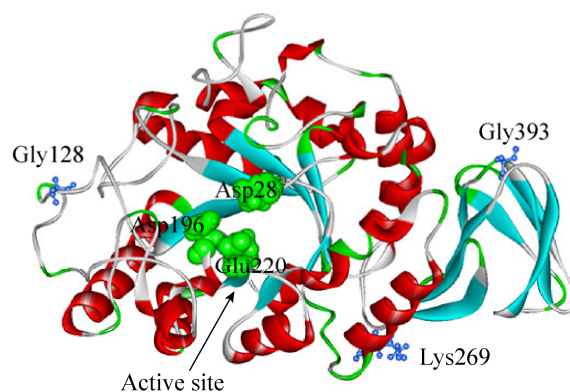


图 1 ROAmy 的 3D 结构模型

Fig. 1 Three-dimensional model structure of ROAmy. The core catalytic residues Asp196, Glu220 and Asp287 from fungal α -amylase [21] are rendered as CPK (Corey-Pauling-Koltun) mode. The selected mutant sites of Gly128, Lys269 and Gly393 are shown as ball and sticks.

表 3 ROAmy 及其突变体蛋白-配体相互作用能
Table 3 The interaction energy of ROAmy and its mutants

Enzyme	Potential energy (kcal/mol)	Van der Waals energy (kcal/mol)	Electrostatic energy (kcal/mol)
ROAmy	-131.23	-46.63	-84.59
G128L	-207.79	-38.50	-169.29
G128W	-197.66	-40.84	-156.82
G128K	-195.58	-38.88	-156.70
K269L	-216.53	-40.83	-175.70
K269W	-196.70	-39.51	-157.26
K269H	-165.96	-44.05	-121.91
G393P	-236.05	-45.74	-190.32
G393T	-210.35	-38.65	-170.70
G393C	-176.03	-41.35	-134.69

2.2 温度对酶活力及酶蛋白稳定性的影响

温度对酶活力影响研究结果显示 , 与原酶 ROAmy 的最适反应温度 (50 $^{\circ}\text{C}$) 相比 , 所有突变体的最适反应温度均产生了偏移。其中 , 突变体 G393P 的最适反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$, 其他 6 个突变体的最适反应温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ (图 2A)。热稳定性研究表明 , 所有突变体的热失活半衰期均得到了不同程度的提升 (图 2B) , 突变体 G128L、K269L、

G393P、G128L/K269L、K269L/G393P、G128L/G393P 和 G128L/K269L/G393P 的热失活半衰期分别约为原酶的 1.20、2.56、5.20、2.79、3.07、3.35 和 5.63 倍,表明突变体的热稳定性得到了显著提升,尤其是组合突变体 G128L/K269L/G393P。

2.3 pH 对酶活力及酶蛋白稳定性的影响

pH 作用条件研究表明 7 个突变体的最适反应 pH 均与原酶相似,即在 pH 5.5 时具有最高催化活力(图 3A)。其中,在 pH 4.0 和 pH 4.5 条件下部分突变体的催化活力得到了提高,如组合突变体

G128L/K269L、K269L/G393P、G128L/G393P 和 G128L/K269L/G393P 在 pH 4.5 时的催化效率分别约为原酶的 1.44、1.31、1.23、1.28 倍。此外,与原酶相比,各突变体在更高的 pH 条件下亦表现出了较高的催化活力,突变体 G128L、K269L 和 G128L/K269L/G393P 在 pH 7.0 时的催化效率分别约为原酶的 2.32、2.06、1.76 倍(图 3A)。然而 pH 稳定性测定结果显示 7 个突变体在 pH 值低于 5.0 条件下的稳定性较原酶略有下降,仅在 pH 值高于 5.5 时表现出了较好的稳定性(图 3B)。

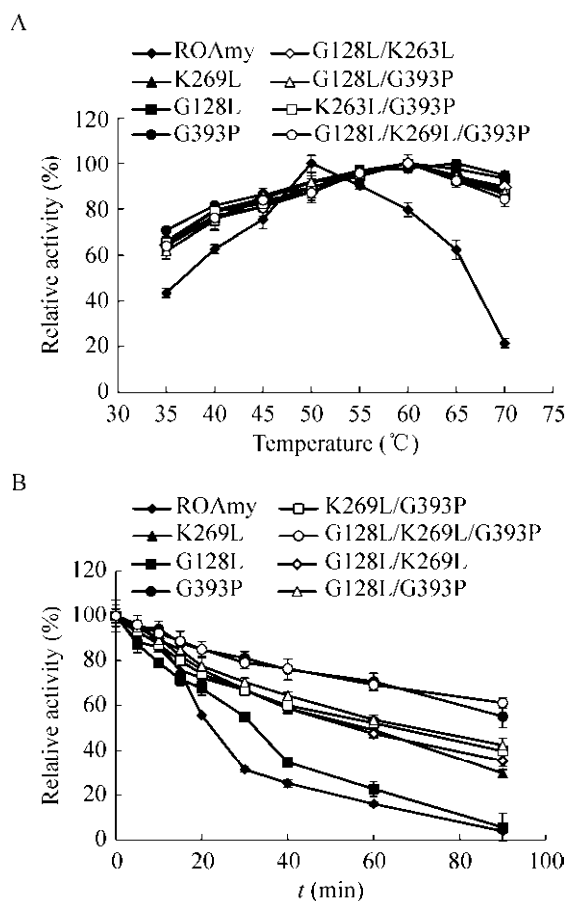


图 2 温度对 ROAmy 及其突变体酶活力 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the activity and stability of ROAmy and its mutants. (A) The optimum temperature of ROAmy and mutants. (B) The thermostability of ROAmy and mutants.

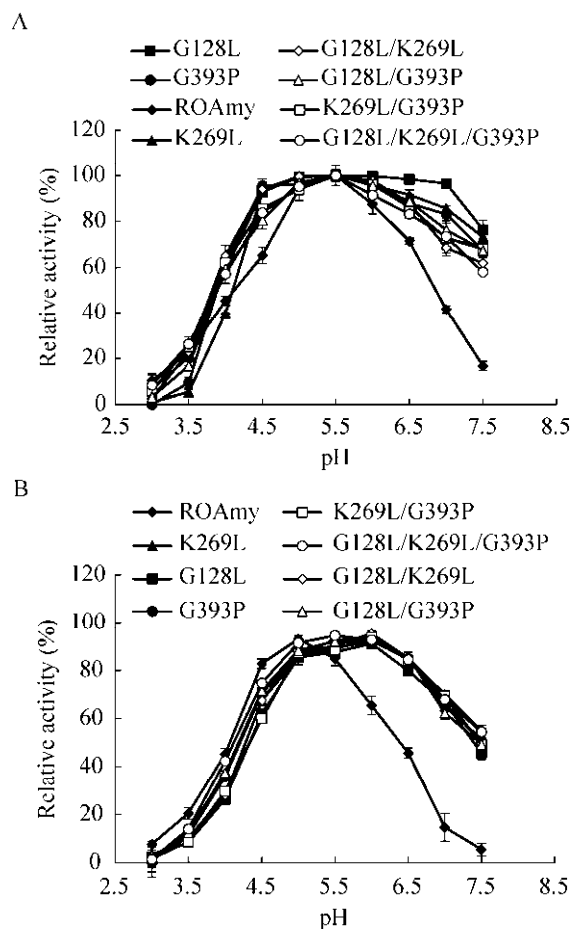


图 3 pH 对 ROAmy 及其突变体酶活力 (A) 和稳定性 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of pH on the activity and stability of ROAmy and its mutants. (A) The optimum pH of ROAmy and mutants. (B) The pH stability of ROAmy and mutants.

通过与原酶相比较可以发现,各突变体在相对偏碱性的范围内 (pH 6.0–7.5) 表现出了更高的催化活力和稳定性。

2.4 动力学参数的测定

在热稳定性得到提高的同时,酶促动力学参数研究表明各突变体在底物结合能力和催化效率方面也分别得到了不同程度的提高(表4),其中,突变体 G128L、K269L 和 G128L/G393P 对底物(可溶性淀粉)的亲合力得到了明显的提高, K_m 值相比原酶分别降低了 32.64%、29.17% 和 27.78%;同时,突变体 G393P、K269L/G393P、G128L/G393P 和 G128L/K269L/G393P 的 V_{max} 分别约是原酶的 1.42、1.19、1.38、1.65 倍;此外,突变体 G128L、G393P、G128L/G393P 和 G128L/K269L/G393P 的 k_{cat}/K_m 分别约是原酶的 1.72、1.83、2.40、2.00 倍。

2.5 热稳定性的分子机制解析

为研究突变体热稳定性提高的分子机制,利用结构建模对以上突变体结构功能进行初步分析。通过对原始酶和突变体 G128L 蛋白质结构模型比较分析,可以看出当原始蛋白中位于蛋白质表面且柔性极强的 G128(图4A)突变为疏水性较好的 L128(图4B)之后,G122 和 T123 分别与 Y133 形成了氢键(图4B),氢键的总数目由原来的 350 个增加到 352 个。虽然蛋白质整体结构在突变前后没有发生显著变化,但是蛋白质的局部微观结构可能由于 Leu 对 Gly 的替换而发生了改变,从而可以促使在其他氨基酸之间形成更多的氢键并增强了该无规则卷曲区域结构的稳定性。因此,突变后蛋白质微观结构的调整和其他氨基酸之间新的氢键的形成可能是突变体 G128L 比原酶具有更好的热稳定性的主要原因。

表 4 ROAmy 和突变体的比酶活以及动力学参数

Table 4 Specific activities and kinetic parameters of ROAmy and its mutants

Enzyme	K_m (mg/mL)	V_{max} (mg/min)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (mL/(mg·s))	Specific activity (U/mg)
ROAmy	1.44±0.05	0.10±0.02	93.59±16.20	64.99±11.25	198.02±13.99
G128L	0.97±0.03	0.10±0.02	108.40±2.80	111.75±2.89	215.53±40.08
K269L	1.02±0.03	0.09±0.01	74.23±1.10	72.77±1.08	180.74±25.45
G393P	1.66±0.25	0.15±0.02	197.23±16.53	118.81±9.96	261.79±45.50
G128L/K269L	1.37±0.16	0.09±0.04	71.45±3.43	52.15±2.50	174.17±21.77
K269L/G393P	1.53±0.14	0.12±0.05	77.68±3.17	50.77±2.07	152.77±8.46
G128L/G393P	1.04±0.01	0.14±0.04	162.50±5.06	156.25±4.86	233.37±30.57
G128L/K269L/G393P	1.46±0.15	0.17±0.07	189.63±8.06	129.89±5.51	241.31±34.33

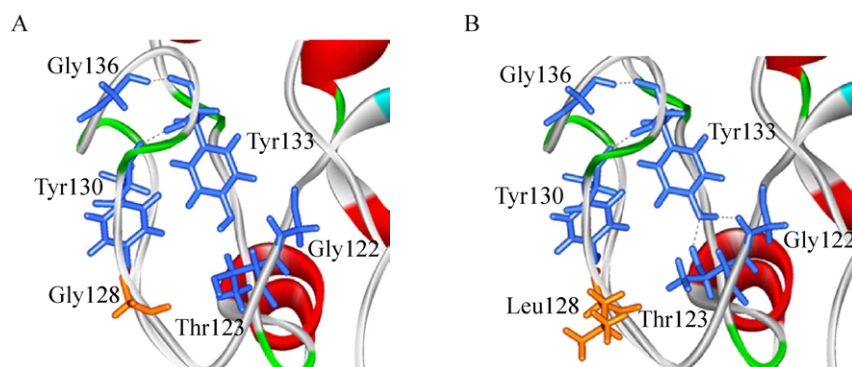


图 4 ROAmy (A) 及其突变体 G128L (B) 的局部 3D 结构模型

Fig. 4 Partial three-dimensional model structures of ROAmy (A) and G128L (B). Amino acids residues are shown as sticks and hydrogen bonds are presented as dotted lines.

原酶蛋白质结构建模显示 K269 可分别与 F265 和 N270 形成一个氢键 (图 5A), 当 K269 突变为 L269 之后, L269 与 N270 之间则没有氢键作用, 同时在 I276 和 L279 之间形成新的氢键 (图 5B)。此外, 原酶蛋白质中位于无规则卷曲处的 Y133 仅与邻近的 G136 和 Y130 形成氢键 (图 5C), 而在突变体 K269L 中 Y133 可以同时与邻近的 G136、Y130 以及 G122 形成氢键 (图 5D), 因此使得氢键的总数目由原蛋白质中的 350 个增加到突变体 K269L 中的 351 个。这种由一个氨基酸残基突变而引起其他远距离氨基酸残基之间相互作用发生改变的现象在嗜碱单胞菌 *Alkalimonas amylolytica* 碱性 α -淀粉酶的突变过程中也发现过^[22]。有趣的是, G128L 和 K269L 两个突变体中都在 Y133 和 G122 之间形成了新的氢键作用。由图

5B 可知 L269 位于该 α -螺旋结构的外侧, 而 Leu 属于疏水性氨基酸且含有 Leu 的侧链更倾向于包埋在蛋白质的内部从而使该局部结构更为紧密和稳定^[23]。由此推测, 疏水性氨基酸 (Leu) 对局部蛋白质结构的稳定作用以及由于微观结构改变而形成的更多的氢键作用可能是突变体 K269L 具有较高热稳定性的主要原因。

此外, 在 ROAmy 中, G393 位于该酶 Domain C 的一段柔性较强的 β -折叠结构转角区域内 (如图 1 和图 6A 所示), 而 Gly 作为柔性最强的氨基酸出现在柔性又相对较强的 β -折叠结构中可能使得蛋白质处于一种易于变化的不稳定状态。同时, B-factor 值的计算结果亦显示 G393 是 ROAmy 中最不稳定的一个氨基酸。当将 ROAmy 中 393 位的 Gly 突变为 Pro 之后, 原酶中 Q392 与 N374 之

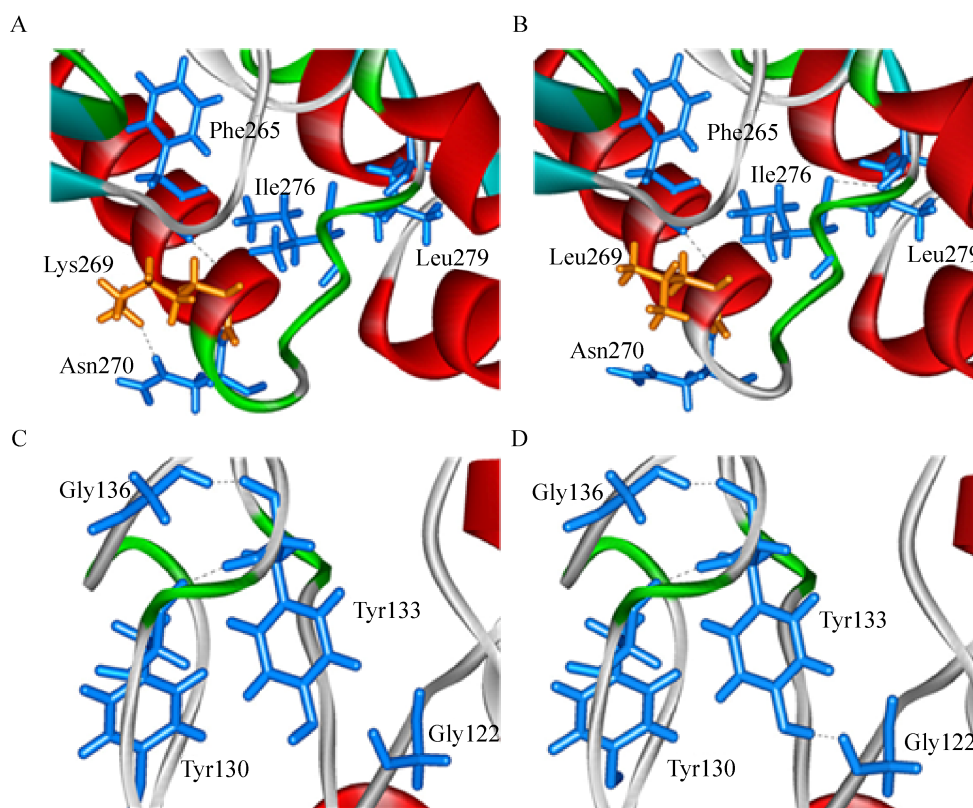


图 5 ROAmy (A, C) 及其突变体 K269L (B, D) 的局部 3D 结构模型

Fig. 5 Partial three-dimensional model structures of ROAmy (A, C) and K269L (B, D). Amino acids residues are shown as sticks and hydrogen bonds are presented as dotted lines.

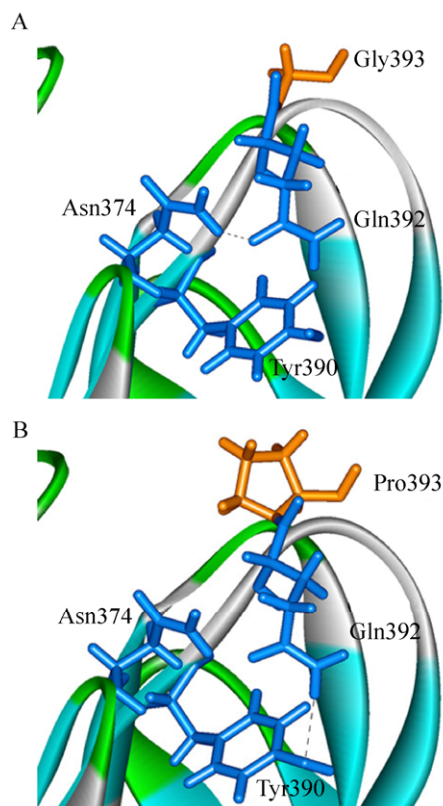


图 6 ROAmy (A) 及其突变体 G393P (B) 的局部 3D 结构模型

Fig. 6 Partial three-dimensional model structures of ROAmy (A) and G393P (B). Amino acids residues are shown as sticks and hydrogen bonds are presented as dotted lines.

间的氢键 (图 6A) 消失,而在突变体 G393P 中重新于 Q392 和 Y390 之间形成了氢键。与原酶相比,虽然突变体 G393P 的氢键数目没有发生变化,但该突变体的热失活半衰期却是原酶的 5.20 倍,是 3 个单突变体中最稳定的一个。通过氨基酸结构分析可知 Pro 由于自身的吡咯烷环结构而具有较小的空间构象自由度,因此 Pro 属于一种刚性氨基酸并可能增强其所在区域结构的刚性。在氢键数目没有变化的情况下,这种在柔性结构中利用刚性氨基酸 (Pro) 替代柔性氨基酸 (Gly) 而提高蛋白质局部区域刚性的现象,可能是突变体 G393P 热稳定性得到显著增强的主要原因之一。

3 讨论

有关 α -淀粉酶蛋白质结构与酶的热稳定性、pH 耐受性或盐浓度耐受性等理化性质之间的关系的研究绝大部分都集中在细菌 α -淀粉酶领域^[24-26],而对真菌 α -淀粉酶的相关研究则鲜有报道。目前已知米曲霉 α -淀粉酶 (Taka-amylase) 中的 Asp206、Glu230 和 Asp297 是该酶的核心催化位点^[21],同时上述 3 个氨基酸残基也是 α -淀粉酶家族共有的主要催化位点^[27],但是真菌 α -淀粉酶中其他绝大部分氨基酸残基的功能均是未知的。基于此,在没有任何已知、可参考的数据前提下,本研究为了快速、有效地提升 ROAmy 的热稳定性,在设计中结合了 B-factor 值运算和分子动力学模拟两种优化设计方法并分别对 ROAmy 中 B-factor 值较高的前 3 个氨基酸残基进行了突变。结果显示,3 个单突变体和 4 个组合突变体的热稳性均得到了不同程度的提高,其中单突变体 G393P 和组合突变体 G128L/K269L/G393P 的 $t_{1/2}$ 分别是 ROAmy 的 5.20 倍和 5.63 倍。然而,组合突变体 K269L/G393P 和 G128L/G393P 的 $t_{1/2}$ 则小于单突变体 G393P 的 $t_{1/2}$,并没有表现出一些研究在组合突变体中发现的累积效应或协同效果^[22,28],可能是由于组合突变体并不是严格意义上单突变体效应的叠加且突变体与突变体之间也存在一定的拮抗效应^[29]。

影响蛋白质热稳定性的因素主要有氢键、盐键、疏水相互作用和二硫键等,且不同类型的蛋白质具有不同的与其热稳定性相关的影响因素^[30],如在葡聚糖内切酶 CelA 的 β -转角和无规则卷曲处等构象不稳定区域引入脯氨酸后可以显著增强蛋白质的热稳定性^[31],在 α -淀粉酶催化区域中引入氢键和盐键可提高酶蛋白质在低 pH 下的稳定性和催化效率^[32]。通过比较 ROAmy 及其单突变体蛋白质结构之间的差异,发现氢键和脯氨酸的引入可能是突变体热稳定性得到提高的主要因

素。本文中所采用的设计方法和所获得的实验结果对其他真菌 α -淀粉酶或工业用酶的热稳定性定向进化研究可能具有一定的参考价值。

REFERENCES

- [1] Hua HF, Luo HY, Bai YG, et al. A thermostable glucoamylase from *Bispora* sp. MEY-1 with stability over a broad pH range and significant starch hydrolysis capacity. PLoS ONE, 2014, 9(11): e0113581.
- [2] Li S, Zuo ZR, Niu DD, et al. Gene cloning, heterologous expression, and characterization of a high maltose-producing α -amylase of *Rhizopus oryzae*. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 164(5): 581-592.
- [3] Zeng J, Guo JJ, Yuan L, et al. Optimization of the thermal activity and stability of hyperthermophilic α -amylase ApkA. Biotechnol Bull, 2017, 33(8): 192-198 (in Chinese).
曾静, 郭建军, 袁林, 等. 极端嗜热 α -淀粉酶 ApkA 的高温活性和热稳定性的优化研究. 生物技术通报, 2017, 33(8): 192-198.
- [4] El-Okki AAKEH, Gagaoua M, Bennamoun L, et al. Statistical optimization of thermostable α -amylase production by a newly isolated *Rhizopus oryzae* strain FSIS₄ using decommissioned dates. Waste Biomass Valori, 2017, 8(6): 2017-2027.
- [5] Qian Y, Duan G. New acid-stable fungal α -amylase for maltose syrup production. Food Ferment Indust, 2008, 34(2): 87-89 (in Chinese).
钱莹, 段刚. 新型耐酸真菌淀粉酶在麦芽糖生产上的应用. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 87-89.
- [6] Shen W, Lin LZ, Huang WW, et al. Heterologous expression of an acid-resistant fungal α -amylase and characterization of its recombinant enzyme. Food Ferment Indust, 2013, 39(8): 1-6 (in Chinese).
沈微, 林丽珍, 黄雯雯, 等. 一种酸性真菌 α -淀粉酶的异源表达与重组酶性质. 食品与发酵工业, 2013, 39(8): 1-6.
- [7] Li S, Wang ZX. Progress in research of fungal α -amylase. Biotechnol Bull, 2011, 224(3): 66-71 (in Chinese).
李松, 王正祥. 真菌 α -淀粉酶的研究进展. 生物技术通报, 2011, 224(3): 66-71.
- [8] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. Angew Chem Int Ed, 2006, 45(46): 7745-7751.
- [9] Pang YP. Use of multiple picosecond high-mass molecular dynamics simulations to predict crystallographic B-factors of folded globular proteins. Heliyon, 2016, 2(9): e00161.
- [10] Jochens H, Aerts D, Bornscheuer UT. Thermostabilization of an esterase by alignment-guided focussed directed evolution. Protein Eng Des Select, 2010, 23(12): 903-909.
- [11] Duan XG, Chen S, Ai YX, et al. Enhancing the thermostability of *Serratia plymuthica* sucrose isomerase using B-factor-directed mutagenesis. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0149208.
- [12] Zhang JH, Lin Y, Sun YF, et al. High-throughput screening of B factor saturation mutated *Rhizomucor miehei* Lipase thermostability based on synthetic reaction. Enzyme Microb Technol, 2012, 50(6/7): 325-330.
- [13] Liu XM, Zhang PP, Hu S, et al. Semi-rational molecular engineering to improve thermostability of cytochrome P450 BM-3. J Chem Eng Chin Univ, 2015, 29(5): 1138-1144 (in Chinese).
刘晓萌, 张彭湃, 胡升, 等. 细胞色素 P450 BM-3 热稳定性的半理性改造. 高校化学工程学报, 2015, 29(5): 1138-1144.
- [14] Chen ZG, Fu Y, Xu WB. Insight into thermal stability of CGTase active site region by molecular dynamics simulation. Comput Appl Chem, 2013, 30(9): 967-972 (in Chinese).
陈志国, 傅毅, 须文波. 分子动力学模拟研究 CGTase 酶活性区域的热稳定性. 计算机与应用化学, 2013, 30(9): 967-972.
- [15] Huang J, Xie DF, Feng Y. Engineering thermostable (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus terreus* through in silico design employing B-factor and folding free energy calculations. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 483(1): 397-402.
- [16] Li Z, Duan XG, Chen S, et al. Improving the reversibility of thermal denaturation and catalytic efficiency of *Bacillus licheniformis* α -amylase through stabilizing a long loop in domain B. PLoS ONE, 2017, 12(3): e0173187.
- [17] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation

- mutagenesis(ISM) for rapid directed evolution of function enzymes. *Nat Protoc*, 2007, 2(4): 891–903.
- [18] 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.
- [19] Xiao ZZ, Reginald S, Adrian T. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Anal Biochem*, 2006, 351(1): 146–148.
- [20] Ó'Fágáin C. Enzyme stabilization-recent experimental progress. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(2/3): 137–149.
- [21] Matsuura Y, Kusunoki M, Harada W, et al. Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J Biotechnol*, 1984, 95(3): 697–702.
- [22] Deng ZM, Yang HQ, Li JH, et al. Structure-based engineering of alkaline α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica* for improved thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(9): 3997–4007.
- [23] Yang J, Li LZ, Xiao YZ, et al. Identification and thermoadaptation engineering of thermostability conferring residue of deep sea bacterial α -amylase AMY121. *J Mol Catal B-Enzym*, 2016, 126: 56–63.
- [24] Singh S, Guruprasad L. Structure and sequence based analysis of alpha-amylase evolution. *Protein Peptide Lett*, 2014, 21(9): 948–956.
- [25] Deng ZM, Yang HQ, Shin HD, et al. Structure-based rational design and introduction of arginines on the surface of an alkaline α -amylase from *Alkalimonas amylolytica* for improved thermostability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(21): 8937–8945.
- [26] Saxena RK, Dutt K, Agarwal L, et al. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. *Bioresource Technol*, 2007, 98(2): 260–265.
- [27] Sharma A, Satyanarayana T. Structural and biochemical features of acidic α -amylase of *Bacillus acidicola*. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 416–423.
- [28] Li Z, Duan XG, Wu J. Improving the thermostability and enhancing the Ca^{2+} binding of the maltohexaose-forming α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biotechnol*, 2016, 222: 65–72.
- [29] Wen S, Tan TW, Zhao HM. Improving the thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol*, 2012, 164(2): 248–253.
- [30] Yi Y, Wei YD, Deng C, et al. Research progress of amino acid residues in the protein thermal stability mechanism. *J Guangxi Univ Sci Technol*, 2015, 26(4): 1–5 (in Chinese).
易弋, 韦阳道, 邓春, 等. 氨基酸残基在蛋白质热稳定性机制中的研究进展. *广西科技大学学报*, 2015, 26(4): 1–5.
- [31] Yi ZL, Pei XQ, Wu ZL. Introduction of glycine and proline residues onto protein surface increases the thermostability of endoglucanase CelA from *Clostridium thermocellum*. *Bioresource Technol*, 2011, 102(3): 3636–3638.
- [32] Yang HQ, Liu L, Shin HD, et al. Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of α -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions. *J Biotechnol*, 2013, 164(1): 59–66.

(本文责编 郝丽芳)