

研究报告

理性设计二硫键提高华根霉脂肪酶热稳定性

王睿^{1,2,3} 喻晓蔚^{1,3*} 徐岩^{1,3*}

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学药学院 江苏 无锡 214122)

(3. 宿迁市江南大学产业技术研究院 江苏 宿迁 223814)

摘要:【背景】华根霉脂肪酶的工业应用前景广泛,但是受到酶热稳定性较差的限制。【目的】对华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶 r27RCL 分子结构进行理性设计,以提高该酶热稳定性。【方法】以 Disulfide by design 软件筛选 r27RCL 分子表面能够形成二硫键的突变位点,共得到 7 对二硫键突变。利用全质粒 PCR 进行定点突变,并在毕赤酵母中表达获得突变酶。【结果】最佳突变酶 m9/10 (S85C-Q145C)与野生型酶 r27RCL 相比,60 ℃ 下的半衰期分别提高了 4.5 倍, T_m 值提高了 4.2 ℃,而催化活性保持不变。蛋白质晶体结构模拟显示,位于 β_2 折叠上的 85C 和位于 α_4 螺旋上的 145C 可形成二硫键,从而提高酶的热稳定性。【结论】酶分子中引入新增二硫键可以显著提升酶的热稳定性。

关键词: 华根霉脂肪酶, 热稳定性, 二硫键, 理性设计

Rationale design of disulfide bond in *Rhizopus chinensis* lipase to improve thermostability

WANG Rui^{1,2,3} YU Xiao-Wei^{1,3*} XU Yan^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. Suqian Industrial Technology Research Institute of Jiangnan University, Suqian, Jiangsu 223814, China)

Abstract: [Background] Poor thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase limits its potential in industrial applications. [Objective] Rationale molecular design was used to improve the thermostability of r27RCL (from *Rhizopus chinensis* lipase CCTCC M201021). [Methods] Seven eligible cysteine pair mutations were selected according to the prediction of the Disulfide by design algorithm. Mutant gene was produced by whole-plasmid PCR and then expressed in *Pichia pastoris* to obtain mutant lipases. [Results] The optimal mutant enzyme m9/10 (S85C-Q145C) showed

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31671799); Six Talent Peaks Project in Jiangsu Province (NY-010)

*Corresponding authors: Tel: 86-510-85918201

E-mail: YU Xiao-Wei: bioyuxw@aliyun.com; XU Yan: yxu@jiangnan.edu.cn

Received: February 08, 2018; **Accepted:** May 04, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 04, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31671799); 江苏省“六大人才高峰”人才项目(NY-010)

*通信作者: Tel: 86-510-85918201

E-mail: 喻晓蔚: bioyuxw@aliyun.com; 徐岩: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2018-02-08; **接受日期:** 2018-05-04; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-04

improved thermostability with a 4.5-fold increase in $t_{1/2}$ at 60 °C and a 4.2 °C increase of T_m compared with the parent enzyme, without compromising the catalytic efficiency. A disulfide bond between 85 cysteine residue (located in 2nd β -sheet) and 145 cysteine residue (located in 4th α -helix) was introduced into the lipase according to the crystal structure, leading to the improved thermostability of lipase. **[Conclusion]** The thermostability of fungal lipase could be greatly improved by newly introduced disulfide bond.

Keywords: *Rhizopus chinensis* lipase, Thermostability, Disulfide bond, Rational prediction

脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) 又名三酰甘油酯水解酶, 是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和脂肪酸, 同时也能催化酯合成和酯交换的特殊生物催化剂^[1]。脂肪酶广泛应用于化学、食品、制药、洗涤剂等领域^[1-2], 通常需要高温反应条件, 而中温脂肪酶的热稳定性欠佳, 限制了它们在工业中的大规模应用。

本研究室在前期研究中从酿造浓香型大曲酒的酒曲中筛选到一株华根霉 (*Rhizopus chinensis* CCTCC M201021)^[3], 从中克隆得到脂肪酶基因 *proRCL*, 并在毕赤酵母中实现了 r27RCL 的高效表达^[4], 实现了其在食品烘焙、纸张脱墨等工业生产中的应用。但是, 由于华根霉脂肪酶是中温酶, 热稳定性差^[5], 高温下的半衰期非常短^[6-7]。因此, 提高 r27RCL 的热稳定性很有意义, 不仅可以拓宽该酶的工业应用范围, 如饲料添加行业等, 还能减少酶添加量, 简化生产步骤, 从而降低应用成本。

影响酶分子热稳定性的主要因素包括盐桥、氢键、疏水堆积、二硫键等, 二硫键可以降低酶分子的熵值^[8], 提高酶分子的刚性^[9], 是稳定酶结构最关键的因素^[10]。向酶分子中引入二硫键从而显著提高酶热稳定性的例子很多。Le 等^[11]用理性设计的方法, 向脂肪酶 CalB (Lipase B from *Candida antarctica*) 中引入了 5 组二硫键, 其中最佳一组将突变酶 (A162C-K308C) 于 60 °C 下的 T_m 值提高了 8.5 °C, 50 °C 下的半衰期延长了 4.5 倍; Tan 等^[12]用理性设计的方法, 向圆弧青霉脂肪酶 PcLipI (*Penicillium cyclopium*) 中引入了一组二硫键突变 (V248C-T251C), 并分别于大肠杆菌 (*Escherichia coli* BL21) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris* GS115) 中表达, 与原始酶相比, 突变酶 35 °C 下的半衰期分别

延长了 4.5 倍和 12.8 倍。

华根霉脂肪酶 r27RCL 共 296 个氨基酸, 其中 7 个半胱氨酸形成了 3 对二硫键, 分别是 C56-C295、C67-C70、C262-C271, 3 对二硫键的形成对 r27RCL 的正确折叠及稳定其三维构象有重要作用^[13]。众所周知, 蛋白质热变性最初都是从蛋白质表面的部分开始^[14-15]。因此, 本研究旨在向 r27RCL 分子表面引入半胱氨酸形成二硫键, 利用 Disulfide by design 软件模拟, 寻找位于分子表面能够形成二硫键的潜在突变位点, 将其定点突变成半胱氨酸, 通过增加表面二硫键的数量来提高酶的热稳定性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

QuikChange® Lightning Site-directed Mutagenesis Kit, Stratagene 公司; *Sal*I、*Dpn*I、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase、*Premix Taq*、PCR 产物纯化试剂盒、DL2000、DL10000 DNA marker, 宝生物工程(大连)有限公司; 酵母基因组 DNA 快速抽提试剂盒、引物、质粒提取试剂盒、YNB、DTT, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪、电转仪, Eppendorf 公司。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109、巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 由本实验室保存。重组菌 *E. coli* pPIC9K-*proRCL* CHis 和 *P. pastoris* GS115 pPIC9K-*proRCL* CHis Mut⁺ 由本实验室构建。

1.3 培养基

毕赤酵母培养基 YPD、MD、BMGY 和 BMMY 的配制参见 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。

1.4 突变位点的选择

以脂肪酶 r27RCL 表面可能形成的潜在二硫键

为研究对象, 用 Disulfide by design 软件对 r27RCL 晶体结构(Protein data bank 登录号为 4L3W)进行预测, 筛选键能(χ^3 Angle)处于+97 (± 20)附近的拟二硫键。以 Pymol 软件对脂肪酶晶体结构进行观察, 弃去分子内部拟二硫键, 弃去以脂肪酶催化三联体(S172-H284-D231)中心氨基酸 S172 为中心的 9 Å 范围内的突变位点, 弃去催化中心上覆盖的盖子结构中的突变位点, 并删除结构明显不合理的突变体。若有同一个氨基酸与不同氨基酸可形成二硫键, 则

按照形成二硫键的 B-factor 值, 取值最大的一对氨基酸为研究对象。

1.5 定点突变

采用快速定点突变试剂盒, 以重组质粒 pPIC9K-*proRCL Chis Mut⁺* 为模板, 设计含有突变位点的引物(表 1)进行全质粒 PCR。25 μ L 反应体系: 10 \times QuikChange reaction buffer 2.5 μ L, 模板 25 ng, 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, QuikSolution reagent 0.75 μ L, dNTP mix 0.5 μ L, Quikchange lightning enzyme

表 1 定点突变引物

Table 1 Primers for site-directed mutagenesis protocol

PCR 产物名称	引物名称	引物序列	退火温度
PCR product name	Primers name	Primers sequence (5'→3')	Annealing temperature (°C)
m1	G49C-Fm	GCTCACTAACTACGCT <u>TG</u> IGTTGCTGCTACTGCTTAC	57.5
	G49C-Rm	GTAAGCAGTAGCAGCAACA <u>CA</u> AGCGTAGTTAGTGAGC	
m2	Y73C-Fm	GCAATGTCTCAAGTAT <u>GT</u> TCTTGATGGTAAGC	52.1
	Y73C-Rm	GCTTACCATCAGGA <u>ACA</u> TACTTGAGACATTGC	
m3	I80C-Fm	GTTCCTGATGGTAAGCTT <u>IG</u> TAAAGACCTTCACTTCTCTTC	57.3
	I80C-Rm	GAAGAGAAGTGAAGGTCTT <u>ACA</u> AAGCTTACCATCAGGAAC	
m4	I94C-Fm	GATACCAATGGCTTT <u>IG</u> CTTGAGAAGTGATGCTC	55.3
	I94C-Rm	GAGCATCACTTCTCA <u>AG</u> CAAAAGCCATTGGTATC	
m5	F83C-Fm	GCTTATCAAGACCT <u>IG</u> CACTTCTCTTCTCACTG	55.5
	F83C-Rm	CAGTGAGAAGAGAAGT <u>GC</u> AGGTCTTGATAAGC	
m6	D149C-Fm	CCAAGTTGTCAAAT <u>G</u> CTACTTCCCGTCCG	55.4
	D149C-Rm	CGACGGGGAAGTAG <u>CA</u> TTTGACAACTTGG	
m7	V130C-Fm	GATTATTCCTT <u>IG</u> CAAGGGCGCCAAAGTTTAC	56.3
	V130C-Rm	GTGAACTTTGGCGCCCTT <u>G</u> CAAGGAGAATAATC	
m8	A133C-Fm	CTCCTTGCAAGGGCT <u>GT</u> AAAGTTCACGCTGGTTTCC	58.9
	A133C-Rm	GGAAACCAGCGTGA <u>ACT</u> TTACAGCCCTTGCAAGGAG	
m9	S85C-Fm	GACCTTCACT <u>IG</u> CCTTCTCACTGATACCAATG	54.8
	S85C-Rm	CATTGGTATCAGTGAGAAG <u>GCA</u> AGTGAAGGTC	
m10	Q145C-Fm	CCTTTCCTCATACAACT <u>IG</u> CGTTGTCAAAGACTACTTCCCGG	57.8
	Q145C-Rm	CGGGGAAGTAGTCTTTGACA <u>AC</u> GCAGTTGTATGAGGAAAGG	
m11	P194C-Fm	CCAACGTGAAAAGAGATTATCT <u>IG</u> CAAGA <u>ACT</u> TGAGCATC	55.3
	P194C-Rm	GATGCTCAAGTTCTT <u>G</u> CAAGATAAATCTTTTACGTTGG	
m12	G220C-Fm	CGTCGACAGCACCT <u>GT</u> ATTCCCTTCCACCGTAC	58.9
	G220C-Rm	GTACGGTGGAAGGGAAT <u>ACA</u> GGTGCTGTGACG	
m13	A213C-Fm	CGTAACAATGCATT <u>CT</u> GCTACTACGTCGACAGCACC	58.7
	A213C-Rm	GGTGCTGTGACGCTAGTAGCAGAATGCATTGTTACCG	
m14	L244C-Fm	GCCTTCGGTTAT <u>IG</u> TACCCCGGTGTC	56.8
	L244C-Rm	GACACCGGGT <u>GCA</u> ATAACCGAAGGC	

注: 下划线标出部分为半胱氨酸突变位点。

Note: Underlined 'mutant' bases for Cysteine.

0.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 55–63 $^{\circ}\text{C}$ (退火温度根据引物 T_m 值设定) 1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$ 11 min, 共 18 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物经 *Dpn* I 消化, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 涂布在含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 平板上。挑取阳性克隆子培养并提取质粒, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得的突变质粒命名为 pPIC9K-*proRCLm CHis*。

1.6 重组脂肪酶工程菌的构建

将突变成功的质粒 pPIC9K-*proRCLm CHis* 用 *Sal* I 线性化, 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞。取 8 μL 浓度为 1 g/L 的线性化质粒与 80 μL 感受态细胞混合均匀, 转至 0.2 cm 冰预冷的电激杯中。冰上放置 5 min, 电压 1 500 V 进行电击。立刻加入 1 mL 1 mol/L 山梨醇复苏, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h。将转化液涂布于 MD 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。

将 MD 平板上生长出的 His⁺转化子接种到 5 mL YPD 溶液中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养 16 h, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 破碎细胞提取基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 以 α -Factor 和 3'-AOX 为上、下游引物进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系: *Premix Taq* 12.5 μL , 模板 25 ng, 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , ddH₂O 11 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 11 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。扩增成功的为阳性工程菌。

1.7 重组脂肪酶的表达、纯化和初步筛选

将阳性转化子接种于含 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养到 OD_{600} 至 4.0。8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 100 mL 的 BMMY 重悬菌体, 使 OD_{600} 为 1.0, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 继续培养, 每 24 h 补加 0.5% (体积比) 甲醇诱导表达。96 h 后收集菌液, 8 000 r/min 离心 5 min 收集上清液。

取 25 mL 发酵上清液利用镍柱进行亲和层析, 在 250 mmol/L 咪唑浓度时洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白洗脱峰, 利用 SDS-PAGE 进行纯度测定后, 用于脂肪酶酶活和热稳定性的初步检测。同时, 以

Bradford 法测定纯化前后的上清液和目的蛋白洗脱液的蛋白浓度; 利用 *pNPP* 法^[16]测定纯化前后的上清液和目的蛋白洗脱液的酶活: 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8.5 条件下, 1 min 产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量定义为 1 个脂肪酶水解酶活国际单位(U)。

将各突变酶置于 55 $^{\circ}\text{C}$ 下热处理 10 min, 以 r27RCL 残留活力为 100%, 得到各突变酶残留活力与 r27RCL 的比较。将酶活及热稳定性下降严重的突变酶弃去, 剩余酶测定酶学性质。

1.8 突变脂肪酶酶学性质研究

利用 *pNPP* 法测定纯化后的突变脂肪酶最适 pH 及 pH 稳定性, 以及最适温度和温度稳定性及 60 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期。60 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期测定方法为: 10 U 纯化酶于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下处理, 每间隔 15 s 取样, 冰浴 20 min, 室温平衡 5 min, 测定酶活。取出后酶活为未热处理时 50% 的时间, 即为酶在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期 $t_{1/2}$ 。 T_m 值是在某温度下放置一定时间后, 使酶活降为原来 50% 的温度^[17]。 T_m 值测定方法为: 10 U 纯化酶于 40–65 $^{\circ}\text{C}$ 的各温度下热处理 30 min, 冰浴 20 min, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下测定酶活。当酶活为原来的 50% 时, 该热处理温度即为酶的 T_m 值。

以 *pNPP* 作为底物测定纯化后突变脂肪酶的 K_m 值和 k_{cat} 值, K_m 值的测定采用双倒数作图法。测定过程中, 底物浓度范围是 25–1 000 mmol/L。

1.9 突变脂肪酶三维结构模拟

以脂肪酶 r27RCL 晶体结构(Protein data bank 登录号为 4L3W)为模板, 利用 PyMOL 软件对突变脂肪酶的分子结构进行模拟和热稳定性分析。

2 结果与分析

2.1 突变位点的选择

以 Disulfide by design 软件对脂肪酶 r27RCL 晶体结构进行预测, 筛选键能(χ^3 Angle)处于 +97 (± 20) 附近的拟二硫键, 共预测出 33 对。弃去分子内部及催化位点中心氨基酸 S172 的 9 \AA 范围内突变位点, 剩余 13 对; 删除结构明显不合理的突变体, 共剩下 7 对拟二硫键突变位点(表 2), 对它们进行实验。

表 2 7 对二硫键突变

Table 2 Seven pairs of disulfide-bond mutation

突变酶 Mutant enzyme	二硫键突变 Cysteine pairs
m1/2	G49C-Y73C
m3/4	I80C-I94C
m5/6	F83C-D149C
m7/8	V130C-A133C
m9/10	S85C-Q145C
m11/12	P194C-G220C
m13/14	A213C-L244C

2.2 定点突变

对 2.1 中筛选出来的 7 对突变位点设计引物 (表 1)。以 pPIC9K-*proRCLm CHis* 为模板, 通过全质粒 PCR 扩增, 生成含有突变位点的带缺口环状质粒 pPIC9K-*proRCLm CHis* (图 1), *Dpn* I 酶消化去除模板质粒, 转化 *E. coli*, 构建出 *E. coli* pPIC9K-*proRCLm CHis* 重组菌。通过测序分析, 目标突变位点突变成功。

2.3 重组脂肪酶工程菌的构建与表达

将突变质粒 pPIC9K-*proRCLm* 以 *Sal* I 线性化后电击转化毕赤酵母 GS115 感受态, 在 MD 平板上涂

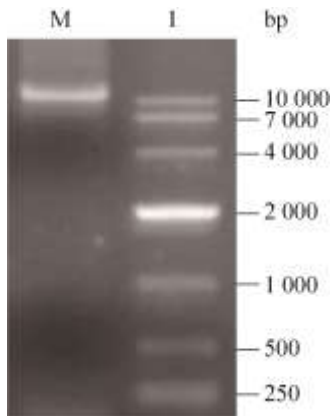


图 1 全质粒 PCR 扩增突变质粒 pPIC9K-*proRCLm CHis* 的电泳图

Figure 1 Amplification of pPIC9K-*proRCLm CHis* by whole-plasmid PCR

注: M: DL10000 DNA 分子量标准; 1: 扩增目的片段 pPIC9K-*proRCLm CHis* (10 345 bp).

Note: M: DL10000 DNA marker; 1: Amplified pPIC9K-*proRCLm CHis* (10 345 bp).

布培养后获得约 100 个转化子, 通过基因组提取和 PCR 扩增的方法挑选阳性转化子 *P. pastoris* GS115 pPIC9K-*proRCLm CHis* Mut⁺。利用 BMGY 和 BMMY 培养及诱导重组脂肪酶表达, 甲醇诱导 84 h 后将发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 利用镍柱对 25 mL 发酵上清液进行亲和层析, 在 250 mmol/L 咪唑浓度时洗脱目的蛋白, 收集目的蛋白洗脱液, 并利用 SDS-PAGE 分析纯化结果。由图 2 可知, 洗脱的目的蛋白分子量大小约为 37 kD。同时, 以 Bradford 法测定纯化前后的上清液和目的蛋白洗脱液的蛋白浓度, 利用 *p*NPP 法测定纯化前后的上清液和目的蛋白洗脱液的酶活, 纯化结果见表 3。

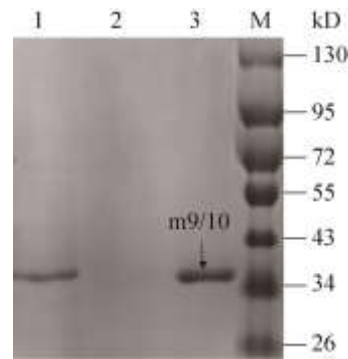


图 2 m9/10 蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳图

Figure 2 SDS-PAGE of m9/10 before/after purification

注: 1: m9/10 诱导 96 h 后的发酵上清液; 2: 穿透峰; 3: 纯化后的目的蛋白 m9/10 (37 kD); M: 蛋白分子量标准。

Note: 1: Fermentation supernatant of m9/10 after 96 h induction; 2: Flowthrough; 3: Purified m9/10 (37 kD); M: Protein marker.

表 3 脂肪酶 r27RCL 和 m9/10 的纯化结果

Table 3 Purification results of lipase r27RCL and m9/10

纯化结果 Purification results	r27RCL	m9/10
上清液总酶活 Total enzyme activity of supernatant (U)	2 120.0	2 094.6
上清液比活 Specific activity of supernatant (U/mg)	419.8	412.2
纯化目的蛋白总酶活 Total enzyme activity of purified lipase (U)	1 569.8	1 506.1
纯化目的蛋白比活 Specific activity of purified lipase (U/mg)	1 265.3	1 158.6
纯化倍数 Purification folds	3.0	2.8
纯化得率 Purification yield (%)	74.0	71.9

2.4 7组二硫键突变的热稳定性初筛

测定各突变酶酶活(表 4), 其中 m3/4 和 m11/12 的酶活下降严重, 仅保存 r27RCL 活力(8.90×10^4 U) 的 7%和 11.8%; 而 m1/2、m5/6、m7/8、m9/10 和 m13/14 的酶活略有所下降, 但都还能保持 70%以上。将酶液置于 55 ℃ 下热处理 10 min, 以 r27RCL 残留活力为 100%, 得到各突变酶残留活力与 r27RCL 的比较。可以看出, m9/10 热稳定性上升幅度最大, m3/4、m11/12 略有上升, m5/6 和 m7/8 有所下降, m1/2 热稳定性下降最严重。即 m9/10 为最佳突变, 在提高了热稳定性的同时没有损失催化活性, 挑选 m9/10 进行后续实验。

2.5 突变脂肪酶 m9/10 的酶学性质

2.5.1 最适温度和温度稳定性

考察原始酶 r27RCL 和突变株 m9/10 的温度稳定性和最适温度。如图 3 所示, 将 r27RCL 和突变酶 m9/10 于 30–50 ℃ 测定酶活, 结果表明 m9/10 的最适温度没有发生变化。将纯化后的酶液于 25–65 ℃ 温度范围内处理 30 min, 冰上放置 20 min, 测定其残余酶活(图 4)。r27RCL 在 45 ℃ 下放置 30 min 后酶活丧失 50%, 50 ℃ 下放置 30 min 后几乎已无酶活残留。突变酶 m9/10 热稳定性明显优于 r27RCL, 在 25–45 ℃ 下热处理 30 min, 酶活均可保存 90%以上; 50 ℃ 下热处理 30 min, 酶活保存约 50%; 但 55 ℃ 下热处理 30 min 后, 酶活几乎完全丧失。原始酶 r27RCL 和突变酶 m9/10 在 60 ℃ 下的半衰期及 T_m 见表 5。

表 4 各突变酶酶活和 55 ℃ 热处理后各脂肪酶突变体与 r27RCL 残余酶活的比较

Table 4 The comparison of the enzyme activity and residual activity after 55 ℃ heat treat between mutants and r27RCL

突变酶 Mutant enzyme	酶活 Enzyme activity ($\times 10^4$ U)	残余活力比较 Increase rate of residual activity (%)
m1/2	7.45 \pm 0.25	-56.30 \pm 1.43
m3/4	0.62 \pm 0.12	+6.50 \pm 1.75
m5/6	8.56 \pm 0.34	-6.60 \pm 0.26
m7/8	6.77 \pm 0.29	-13.50 \pm 1.53
m9/10	8.78 \pm 0.09	+49.20 \pm 2.05
m11/12	1.05 \pm 0.08	+2.80 \pm 0.56
m13/14	7.49 \pm 0.14	+1.60 \pm 1.41

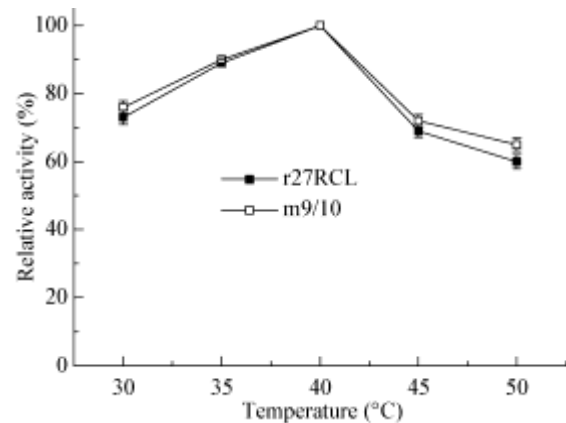


图 3 温度对 r27RCL 和 m9/10 活力的影响

Figure 3 Effect of temperature on the activity of r27RCL and m9/10

2.5.2 最适 pH 和 pH 稳定性

利用 pNPP 法对 r27RCL 和 m9/10 的最适 pH 和 pH 稳定性进行测定。结果表明, 相对于原始酶 r27RCL, m9/10 的最适 pH (图 5) 和 pH 稳定性(图 6) 几乎都没有发生变化。

2.5.3 酶动力学分析

以 pNPP 为底物测定 r27RCL 和 m9/10 的酶动力学参数。如表 6 所示, 突变酶 m9/10 的 K_m 值比 r27RCL 下降了 22.4%, 说明突变酶 m9/10 对于底物 pNPP 的亲合性更高; 但 k_{cat} 值略有下降, k_{cat}/K_m 值基本不变, 说明突变后催化效率几乎未受影响。

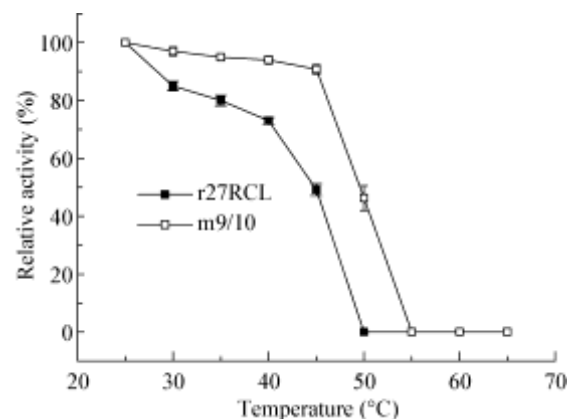


图 4 温度对 r27RCL 和 m9/10 稳定性的影响

Figure 4 Effect of temperature on the stability of r27RCL and m9/10

表 5 原始酶 r27RCL 和突变酶 m9/10 在 60 ℃ 下的半衰期及 T_m

Table 5 Half-lives (60 ℃) and T_m of r27RCL and m9/10

Items	r27RCL	m9/10
$t_{1/2}$ (min, 60 ℃)	0.85	3.85
T_m (℃)	45.0	49.2
ΔT_m (℃)	0.0	4.2

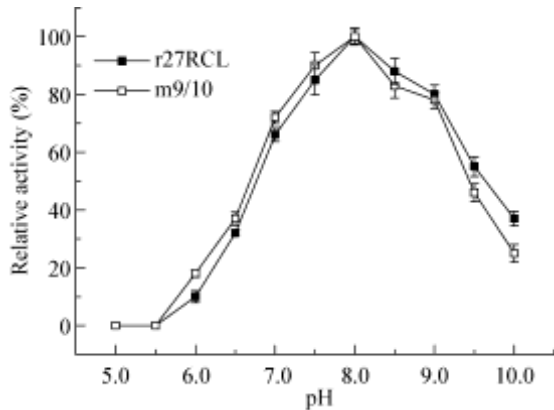


图 5 pH 对 r27RCL 和 m9/10 活力的影响

Figure 5 Effect of pH on the activity of r27RCL and m9/10

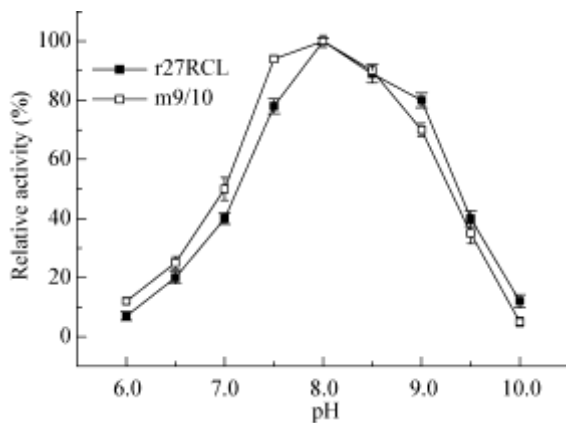


图 6 pH 对 r27RCL 和 m9/10 稳定性的影响

Figure 6 Effect of pH on the stability of r27RCL and m9/10

表 6 原始酶和突变酶 m9/10 的动力学参数

Table 6 Kinetic parameters of r27RCL and m9/10

酶	米氏常数	催化常数	催化效率
Enzyme	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (L/(mmol·s))
r27RCL	0.304	18.90	6.22×10^4
m9/10	0.236	14.52	6.15×10^4

3 讨论与结论

以脂肪酶 r27RCL 晶体结构为模板, 利用 PyMOL 软件对突变脂肪酶的分子结构进行模拟 (图 7), 研究突变位点对酶热稳定性可能产生的影响。两个半胱氨酸突变(S85C 和 Q145C)分别显示为红色和粉色, 位于蛋白质结构表面, 远离酶的催化中心(S172-H284-D231)(绿色部分)和脂肪酶活性中心上的 α 螺旋及两段 Loop 的“盖子结构”(黄色部分)。推测这两个突变不会直接引起酶催化性能的变化, 动力学参数的测定也证明了这一点。

二硫键与蛋白质的折叠过程密切相关, 其键能远大于其他次级键, 在维持高级结构的稳定性方面具有十分重要的作用。研究表明, 二硫键通过降低蛋白质解折叠状态的熵值, 用熵效应来稳定酶分子的构象。二硫键一般出现在 α 螺旋与另一个伸展肽链或末端不规则的 α 螺旋之间, 在 β 折叠上也常有二硫键。

图 8 是 S85C 和 Q145C 这一对二硫键突变前后的三维结构模拟图。85 位的丝氨酸位于 β_2 折叠上,

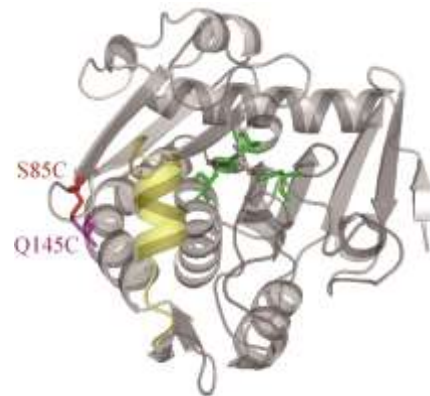


图 7 突变酶 m9/10 突变位点示意图

Figure 7 Mutant cysteine residues in m9/10

注: 绿色部分为催化三联体(S172-H284-D231); 黄色部分为覆盖在脂肪酶活性中心上的 α 螺旋及两段 Loop 的“盖子结构”; 红色和粉色的 2 个氨基酸为突变酶 m9/10 中新增的二硫键突变位点(S85C 和 Q145C)。

Note: The catalytic triad residues (S172-H284-D231) are shown in green; The short α -helix linked to the 'core' of the protein structure by polypeptide hinge residues, called the 'lid' region, is shown in yellow; The two cysteine residue (S85C and Q145C), forming new added disulfide bond in mutant m9/10, is shown in red/pink sticks, respectively.

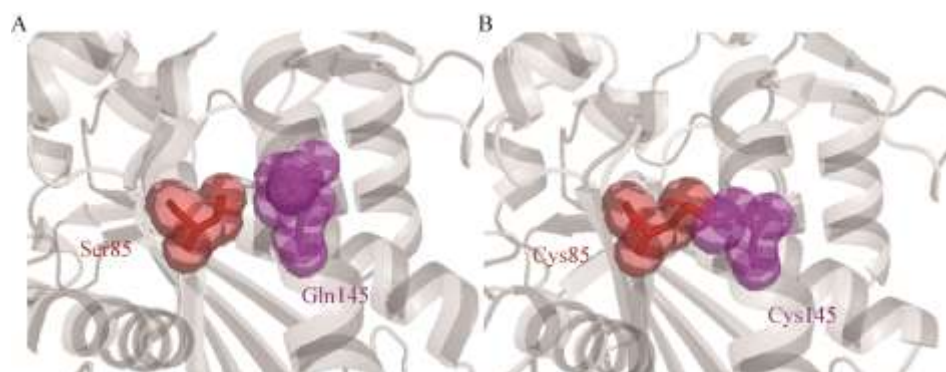


图 8 突变酶 m9/10 (含突变位点 S85C 和 Q145C)突变前(A)、后(B)三维结构模拟

Figure 8 Three-dimensional structures prior (A) and after (B) mutation of m9/10

注: 位点 Ser85 和 Gln145 (A)显示为红色和粉色, 在图 B 中均突变成了 Cys.

Note: Residue Ser85 and Gln145 (A), showing as red and pink sticks, were replaced with cysteine and created a disulfide bridge (B).

145 位的谷氨酰胺位于 $\alpha 4$ 螺旋上^[18], 均突变成半胱氨酸后, 在空间结构上有明显重叠区域形成。将 m9/10 突变酶结构和野生型 r27RCL 结构进行比较, 推测突变酶 85C 和 145C 形成了二硫键, 稳定了 $\beta 2$ 折叠和 $\alpha 4$ 螺旋, 使酶分子的结构更加紧凑, 从而提高了酶的热稳定性。目前对突变体从蛋白模拟的基础上进行结构分析, 今后将会进一步进行晶体结构解析, 深入分析结构与功能之间的关系。

本研究以位于分子表面的氨基酸为研究对象, 一方面由于蛋白质热变性最初都是从蛋白质表面的部分开始的, 另一方面是由于蛋白表面位点远离酶活性中心位点和盖子结构, 可以减少对酶催化活性产生的影响。但是进行实验的 7 组二硫键突变中, 几乎所有突变酶的催化活性均有不同程度的降低, 下降最严重的一组突变酶活力残存不超过 10%。说明即使是酶分子表面的氨基酸, 也能使得整个蛋白质分子刚性变大, 使得酶在油水界面进行催化反应时, 催化位点上方盖子打开幅度受影响; 或者因为酶分子柔性变差, 限制了底物进入活性中心进行反应, 最终导致酶催化能力下降。

以突变酶分子的热稳定性为考量标准, 发现 7 组突变酶中有 3 组酶的热稳定性下降了。推测原因可能是突变位点变成半胱氨酸后也未能成功形成二硫键, 或者是突变位点原来可以和其他氨基酸

形成稳定蛋白的如盐桥、疏水键、氢键等其他作用力, 突变后丧失了原作用力导致热稳定性不升反降。

在下一步的研究中, 将考量酶分子内部潜在的二硫键突变位点。一方面继续寻找能够提高热稳定性的突变位点, 获得叠加效应; 另一方面也可以考量是否分子内部二硫键的产生基本都以牺牲酶活为代价, 为更好地开发脂肪酶提供理论基础。

REFERENCES

- [1] Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29(2): 119-131
- [2] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251
- [3] Xu Y, Wang D, Mu XQ, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 18(1/3): 29-37
- [4] Yu XW, Wang LL, Xu Y. *Rhizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 57(1/4): 304-311
- [5] Kamiya N, Ogawa T, Nagamune T. Enhancement of apparent thermostability of lipase from *Rhizopus* sp. by the treatment with a microbial transglutaminase[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23(19): 1629-1632
- [6] Niu WN, Li ZP, Tan TW. Secretion of pro- and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins[J]. *Molecular Biotechnology*, 2006, 32(1): 73-82
- [7] Hiol A, Jonzo MD, Rugani N, et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit[J]. *Enzyme and*

- Microbial Technology, 2000, 26(5/6): 421-430
- [8] Matsumura M, Signor G, Matthews BW. Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds[J]. Nature, 1989, 342(6247): 291-293
- [9] Alquati C, de Gioia L, Santarossa G, et al. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*: Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling[J]. European Journal of Biochemistry, 2002, 269(13): 3321-3328
- [10] Liebeton K, Zacharias A, Jaeger KE. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(2): 597-603
- [11] Le QAT, Joo JC, Yoo YJ, et al. Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel *in silico* design of disulfide bridge[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(4): 867-876
- [12] Tan ZB, Li JF, Wu MC, et al. Enhancing the thermostability of a cold-active lipase from *Penicillium cyclopium* by *in silico* design of a disulfide bridge[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 173(7): 1752-1764
- [13] Derewenda U, Swenson L, Wei YY, et al. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the fungi *Humicola lanuginosa* and *Rhizopus delemar*[J]. Journal of Lipid Research, 1994, 35(3): 524-534
- [14] Eijssink VGH, Bjørk A, Gåseidnes S, et al. Rational engineering of enzyme stability[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 113(1/3): 105-120
- [15] Johannes TW, Woodyer RD, Zhao HM. Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5728-5734
- [16] 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]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(15): 4836-4841
- [17] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(46): 7745-7751
- [18] Zhang M. Study of *Rhizopus chinensis* lipase structure, dynamic and structure-function relationship in solution using nuclear magnetic resonance assisted by X-ray diffraction[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2017 (in Chinese) 张萌. X 射线衍射辅助核磁共振解析华根霉脂肪酶溶液中结构、动力学特征及构效关系[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2017