

易错 PCR 提高华根霉脂肪酶的热稳定性

王睿^{1,2}, 喻晓蔚¹, 徐岩¹

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

王睿, 喻晓蔚, 徐岩. 易错 PCR 提高华根霉脂肪酶的热稳定性. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1753–1764.

Wang R, Yu XW, Xu Y. Enhanced thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by error-prone PCR. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1753–1764.

摘要: 为了提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的热稳定性, 运用定向进化-易错 PCR 的方法, 经两轮易错 PCR 引入突变, 利用 fast-blue RR 顶层琼脂法对突变文库进行筛选, 第一轮易错 PCR 后筛选到 2 株突变菌株, 第二轮筛选到 4 株突变株。第二轮最佳突变株 Ep2-4, 其中 3 个氨基酸发生了突变: A129S、P168L 和 V329A。该突变酶 ep2-4 在 60 °C 下半衰期相对原始酶 r27RCL 提高 5.4 倍, T_{50} 值提高 7.8 °C。酶学性质研究表明, 突变酶 ep2-4 在热稳定性提高的基础上, 仍保持良好的催化活性。蛋白质三维结构模拟显示, 突变 A129S 可以和 Gln133 形成氢键, 增加了酶表面的亲水性和极性; P168L 可以与邻近的 Leu164 形成疏水键, 导致突变酶的热稳定性提高。

关键词: 定向进化, 易错 PCR, 华根霉脂肪酶, 热稳定性, 毕赤酵母

Received: September 25, 2012; **Accepted:** February 22, 2013

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB710800), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(Nos. 2012AA022207, 2011AA02A209, 2011AA02A210), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP11014), National Natural Science Foundation of China (No. 20802027).

Corresponding author: Yan Xu. Tel: +86-510-85918201; Fax: 86-51085864112; E-mail: yxu@jiangnan.edu.cn,

Xiaowei Yu. E-mail: bioyuxw@yahoo.com.cn

国家高科技研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB710800), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA022207, 2011AA02A209, 2011AA02A210), 中央高校基本科研业务费专项资金 (No. JUSRP11014), 国家自然科学基金 (No. 20802027) 资助。

网络出版时间: 2013-07-19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130719.0925.001.html>

Enhanced thermostability of *Rhizopus chinensis* lipase by error-prone PCR

Rui Wang^{1,2}, Xiaowei Yu¹, and Yan Xu¹

¹ The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

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

Abstract: Directed evolution was conducted to improve the thermostability of lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. Mutations were introduced by two rounds of error-prone PCR and mutant lipase was selected by fast-blue RR top agar screening. Two positive variants were selected in the first-round and four in the second-round screening process. Ep2-4 was proved as the most thermostable lipase and its DNA sequencing revealed three amino acid substitutions: A129S, P168L and V329A. Compared with the parent, its half-life at 60 °C was 5.4- times longer and T_{50} was 7.8 degrees higher. Purified lipase of Ep2-4 was characterized and the result shows that its thermostability improved without compromising enzyme activity. According to the mimicked protein structure, mutation A129S formed a hydrogen bond with Gln133 and improved the thermostability by increasing the hydrophilicity and polarity of protein; mutation P168L by forming a hydrophobic bond with the nearby Leu164.

Keywords: directed evolution, error-prone PCR, *Rhizopus chinensis* lipase, thermostability, *Pichia pastoris*

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 不仅能催化油脂水解, 也能在非水相中催化酯合成、转酯化、酸解等反应, 被广泛地应用于化学、制药、生物能源工业^[1-2]及食品工业^[3-4]中。根霉脂肪酶在脂肪酶体系中有重要地位。根霉属主要包括微孢根霉 *Rhizopus microsporus*、匍枝根霉 *Rhizopus stolonifer* 和米根霉 *Rhizopus oryzae* 3 类, 米根霉中又包括德式根霉 *Rhizopus delemar*、爪哇根霉 *Rhizopus javanicus*、雪白根霉 *Rhizopus niveus* 和少根根霉 *Rhizopus arrhizus*。不同来源的根霉脂肪酶序列有所差异, 但是它们都具有以下共同结构特征: 具有 α/β 水解酶折叠结构特征; 拥有 Gly-X-Ser-X-Gly 模体; 催化三联体由 Ser-His-Asp/Glu 被一个具有两亲性的肽环“盖子”所覆盖。当脂肪酶在油-水界面时, 肽环“盖子”构型发生改变, 催化部位被暴露, 底物与催

化中心接触而进行反应; 稳定性佳、转化效率高。目前已经有超过 30 种商品化的根霉脂肪酶应用于芳香酯、生物柴油、手性化合物的生产中^[5-6]。

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^[5], 从中克隆得到脂肪酶基因 *proRCL*^[7], 并成功实现了脂肪酶 r27RCL 在毕赤酵母中的高效表达以及在发酵罐中的高密度表达^[7-8]。但是, 由于华根霉脂肪酶是中温酶, 热稳定性差^[9], 高温下的半衰期非常短^[10-12]。这不仅限制了其应用范围, 还增加了工业应用成本, 为实际应用带来困难。因此, 提高 r27RCL 的热稳定性至关重要。

定向进化是提高酶的热稳定性最快捷而有效的方法。近 10 年来, 定向进化技术已在脂肪酶热稳定性改造领域取得巨大成功。如: Kohno 等利用易错 PCR, 将来自雪白根霉 *R. niveus* 的

脂肪酶 RNL 的 T_m 值提高了 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[13]。又如谭天伟等经过易错 PCR、DNA shuffling 和筛选,使来自少根根霉 *R. arrhizus* 的脂肪酶 RAL 的最适温度提高 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的半衰期提高为原来的 12 倍^[14]。本研究利用易错 PCR 的方法向该酶中随机引入突变,利用 PCR 依赖型方法构建华根霉脂肪酶基因突变文库^[15],再结合 fast-blue RR 顶层琼脂筛选方法,获得了热稳定性提高的脂肪酶突变株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂 (TaKaRa 宝生物公司),引物 (上海生工生物工程技术服务有限公司) 合成, DL2 000 DNA Ladder marker、E10 000 DNA Ladder marker、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司), Plasmid Mini Kit I (OMEGA BIO-TEK), Stirred Ultrafiltration Cell 8050 Ultrafiltration Membrane (Millipore Corporation, Bedford, U.S.A), SP-Sepharose FF、Phenyl-Sepharose 6 FF (Pharmacia 公司), 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109、巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 由本实验室保存,携带华根霉脂肪酶基因 *proRCL* 的重组质粒 pPIC9K-*proRCL* (本实验室构建),载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.3 培养基

YPD: 1% 酵母膏, 2% 蛋白胨, 2% 葡萄糖;

MD: 1.34% YNB, $4\times 10^{-5}\%$ 生物素, 2% 葡萄糖;

BMMY: 1% 酵母膏, 2% 蛋白胨, 1% 甲醇, 0.1 mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液, 1.34% YNB, 4×10^{-5} 生物素;

BMMYA' 平板: 1% 酵母膏, 2% 蛋白胨, 2% 甲醇, 0.1 mmol/L pH 6.0 磷酸缓冲液, 1.34% YNB, 4×10^{-5} 生物素, 2% 琼脂;

Fast-blue RR 顶层琼脂: A: 80 mg Fast-blue RR 溶于 1 mL 二甲亚砜, B: 20 mg 萘酯溶于 1 mL 二甲基甲酰胺, 取 80 μL A 液, 180 μL B 液和 0.2 g 琼脂于 15 mL 蒸馏水中, 加热溶解备用。

1.2 方法

1.2.1 *proRCL* 的易错 PCR 扩增

以重组质粒 pPIC9k-*proRCL* 为模板, 设计上、下游引物 F 和 R (表 1)。50 μL 易错 PCR 体系如下: 5 μL 10 \times 易错 PCR 缓冲液 (500 mmol/L KCl, 70 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 0.1% (W/V, 明胶)); 0.5 mmol/L dATP/dGTP, 2.5 mmol/L dCTP 和 dTTP; 引物 F/R 各 40 pmol; MgCl_2 7 mmol/L; MnCl_2 0.3 mmol/L; *Taq* 2.5 U, 超纯水补足 50 μL 。PCR 扩增条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

易错 PCR 扩增产物命名为 *pro_mRCL*, 经 DNA 纯化试剂盒纯化备用。

1.2.2 表达载体 pPIK9K 的扩增

以 pPIC9K 为模板, 以 9K-short F 和 9K-short R (表 1) 为引物, 扩增得到 9K-short (2 000 bp) 的短片段; 同样以引物 9K-long F 和 9K-long R

表 1 本研究中用到的引物及其序列

Table 1 The primers used in this study

Primer name	Primer sequences (5'-3')
F	GCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTTACGTAGAATTCCC TAGG
R	GTAAGTGCCCAACTTGAAGTGAAGAACAGTCATGTCTAAGGCGAATTAATTCGCGGCCGC
9K-short F	GGCCGCGAATTAATTCGCCTTAGACATG
9K-short R	AGATCTTGATATAAATTTACGTTTAAAATC
9K-long F	TCGACAATTGGTTTACTAATTCCATAATCTG
9K-long R	ACCTTTCGTCTTTGGATGTTAGTCT

(表 1) 扩增得到 9K-long (7 226 bp) 的长片段。将扩增片段 9K-short 和 9K-long 利用纯化试剂盒纯化后备用。

1.2.3 基因突变文库的构建

利用 PCR 依赖型方法构建高质量酵母基因突变文库^[15]。将 9K-short 和 9K-long 片段等摩尔混合，再与易错 PCR 扩增得到的突变基因 *promRCL* 片段按照摩尔比 1 : 10 混合，于干燥箱中浓缩至体积 < 1 μ L。将混合物电转化毕赤酵母感受态，转化产物涂布于 MD 平板上，30 $^{\circ}$ C 培养 2 d，得到突变文库。以第一轮筛选得到的目的菌株的基因组等摩尔混合物作为第二轮易错 PCR 时的模板。

1.2.4 热稳定性突变菌株的初步筛选

用灭菌牙签将 MD 平板上生长出的 His⁺转化子复制到 YPD 和 BMMYA' 平板的相同位置，同时将对照菌 GS115 pPIC9k-*pro*' 接种至 BMMYA' 平板上。30 $^{\circ}$ C 培养 5 d。

保存生长完毕的 YPD 平板。将 BMMYA' 平板正置于 60 $^{\circ}$ C 热处理 60 min，冰浴 15 min，室温平衡 30 min。将 15 mL 新鲜配制的 Fast-blue RR

顶层琼脂均匀倾倒入处理后的各板上。2 min 内颜色深于阳性对照的菌株为初筛目的菌株。

1.2.5 初筛目的菌株的复筛与鉴定

向 1.8 mL/孔 (平底) 的 96 孔板中加入 300 μ L BMGY 培养基，121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。向其中接入保藏于 YPD 平板上的初筛目的菌株 (同时接入 GS115 pPIC9k-*pro*' 作为对照)，30 $^{\circ}$ C 250 r/min 振荡培养至 OD_{600} 为 2~6 (约 16~18 h)。离心，弃上清，用 900 μ L BMMY 培养基重悬菌体，并加入 1% (V/V) 甲醇诱导脂肪酶表达。此后每 24 h 补加 100 μ L BMMY 培养基和 1% (V/V) 甲醇，诱导 3.5 d。

将诱导表达 84 h 的 96 孔板发酵液 3 000 r/min 离心 10 min，收集上清，于 60 $^{\circ}$ C 热处理 20 min，冰上放置 15 min，室温放置 30 min 平衡。取 1 μ L 上清液稀释 500 倍后，取 5 μ L 于另一 96 孔板中，用排枪加入底物，振荡混匀。2 min 内迅速显示明显黄色的菌株为复筛目的菌株。相同条件下，对照菌 GS115 pPIC9k-*pro*' 的发酵上清液不能显示明显黄色。

复筛目的菌株经过基因的酶切和 PCR 验证

后, 送往上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.6 脂肪酶的诱导表达和分离纯化

将含有氨基酸突变的菌株, 接种至 25 mL BMGY 培养基中, 30 °C 振荡培养 16~20 h 至 OD_{600} 为 2~6, 离心收集菌体, 用 BMMY 培养基稀释至 OD_{600} 为 1, 每隔 24 h 添加 0.5% 的甲醇诱导表达, 培养 3~4 d 后, 收集发酵上清液。

将突变菌株的发酵上清液经过 10 kDa 超滤膜浓缩, SP-Sepharose FF 强阳离子交换层析和 Phenyl-Sepharose 6 FF 疏水色谱柱层析后得到突变脂肪酶活性组分 proRCL。

1.2.7 突变脂肪酶酶学性质研究

利用 pNPP 法对纯化后的突变脂肪酶进行酶活测定^[16]。在 40 °C, pH 8.5 条件下, 每分钟产生 1 μ mol 对硝基苯酚的酶量定义为一个脂肪酶水解酶活国际单位 (U)。

利用 pNPP 法测定纯化后的突变脂肪酶的最适 pH 及 pH 稳定性, 最适温度和温度稳定性及 60 °C 下的半衰期。60 °C 下的半衰期测定方法为: 10 U 纯化酶于 60 °C 下, 经不同的时间间隔取出, 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的 50% 的时间, 即为酶在 60 °C 下的半衰期 $t_{1/2}$ 。 T_{50} 值是在某温度下放置一定时间后, 使酶活降为原来的 50% 的温度^[17]。测定方法为: 10 U 纯化酶于 40 °C~80 °C 的范围内各温度下热处理 30 min, 冰浴 20 min, 室温平衡 5 min 后于 40 °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_{50} 值。

以 pNPP 作为底物测定纯化后的突变脂肪酶的 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。

1.2.8 突变脂肪酶三级结构模拟和热稳定性机理研究

利用同源建模法 (SWISS-MODEL) 对出发脂肪酶进行结构建模, 同源搜索比对发现其三级结构与来自 *Rhizopus niveus* 的脂肪酶 (Protein Data Bank PDB 登录号 1LG Y) 结构同源性最高, 为 80.76%, 以 1LG Y 为模板酶进行同源建模。利用蛋白质模型对热稳定性机理进行分析。

2 结果与分析

2.1 易错 PCR 条件优化

在易错 PCR 中, 较高浓度的 Mg^{2+} 可以稳定非互补的碱基对, 有利于突变。 Mn^{2+} 可以降低聚合酶对模板的特异性。为了得到合适的突变率和较高的突变库容量, 将 Mg^{2+} 浓度和 Mn^{2+} 浓度进行组合优化 (图 1)。将各梯度得到的突变文库进行测序, 结果表明, 梯度 1 (Mg^{2+} 7 mmol/L、 Mn^{2+} 0.1 mmol/L) 的平均突变率为 0.4%, 即每个基因序列平均有 4 个碱基突变; 梯度 2 (Mg^{2+} 9 mmol/L、 Mn^{2+} 0.2 mmol/L) 的平均突变率为 0.6%, 即每个基因序列平均有 6 个碱基突变。梯度 3 和梯度 4 的突变率也较高, 弃用。同时, 将各梯度得到的突变子接种至 BMMYA' 平板上, 甲醇诱导 4 d, 用 fast-blue RR 染色法染色, 确定各梯度平板重组毕赤酵母的表达情况。Fast-blue RR 染色结果显示, 梯度 1 中, 黑色的菌落占总菌落数的 80%; 梯度 2 中, 黑色的菌落占总数的 65%; 梯度 3 和 4 中, 黑色的菌落占总数的 < 30%, 弃用。

综上, 梯度 1, 即 Mg^{2+} 7 mmol/L、 Mn^{2+} 0.1 mmol/L 时突变率 (0.25%) 较为可行。

2.2 表达载体 pPIC9K 的 PCR 扩增

以质粒 pPIC9K 为模板, 9K-longF/R 和 9K-shortF/R 为引物, 分别扩增得到两段大小分别为 7 226 bp 和 2 000 bp 的片段 (图 1)。

2.3 突变文库中突变子热稳定性和酶活的关系

本研究对突变文库中突变子热稳定性和酶活的关系进行研究。在突变文库中随机抽取 2 000 个突变子检测其酶活和热稳定性, 结果如图 2。进化后, 2.5% 的突变子的酶活高于出发菌株, 97% 的突变子保留出发菌株 70% 以上的酶活, 只有少于 0.25% 的突变子在突变后酶活丧失严重。对以上随机抽取的 2 000 株突变体进行热稳定性初步筛选。利用 96 孔板发酵, 得到 2 000 株突变体的粗酶。用 pNPP 法对粗酶进行热稳定性筛选。结果如图 2B: 约 0.3% 的突变酶在热处理后仍可以保持 95% 以上酶活, 约 1% 的突变酶热处理后能保持 90% 以上酶活, 约 2.5% 的突变酶热处理后能保持 80% 以上酶活。考察热处理后酶活保持在 80% 以上的 46 株突变株, 0.05% 的突变子的酶活和热稳定性都得到了显著提高,

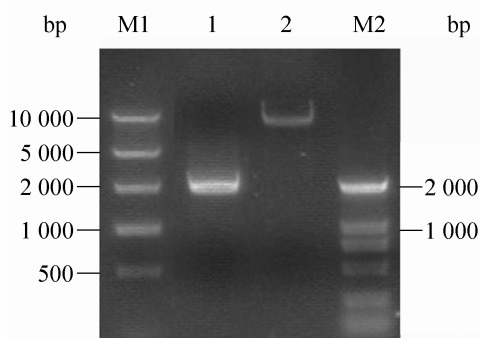


图 1 表达载体 pPIC9K 长短片段的扩增图

Fig. 1 Amplification of pPIC9K-long and pPIC9K-short. M1: E10 000 DNA Ladder marker; M2: 2 000 bp DNA Ladder marker; 1, 2 : pPIC9K-Short (2 000 bp) and pPIC9K-long (7 226 bp).

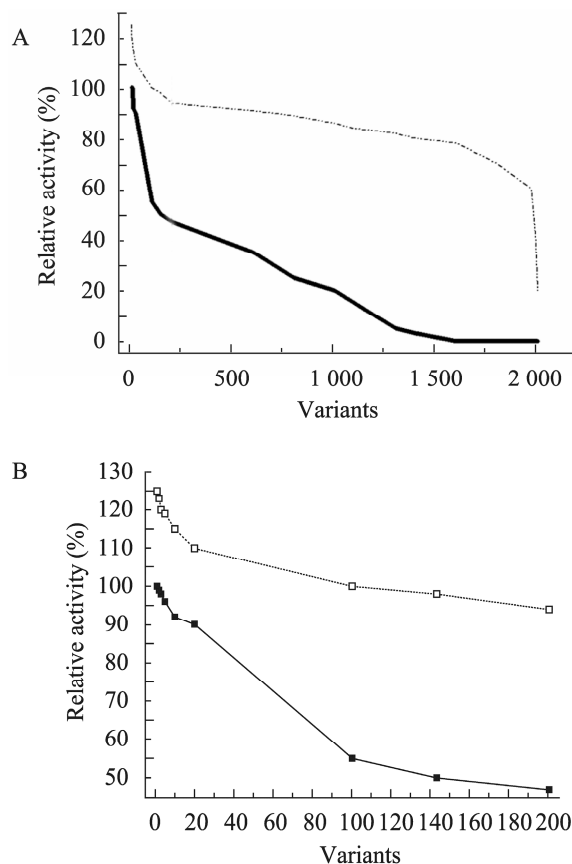


图 2 定向进化构建的突变文库总览图

Fig. 2 The landscape of mutant library. Dash dot line: enzymatic activity of clones in mutant library, plotted in descending order. The solid line: thermostability of clones in mutant library, plotted in descending order. Details in dotted line box in (A) were magnified in (B). For Figure (A), 2 000 clones were randomly selected from the mutant library of first generation, and their enzymatic activities were determined by 96 MTPs screening using pNPP. The enzymatic activity value of each mutant was compared to that of r27RCL, and the ratio was remarked as Y axis of dash dot line. Then, these mutant enzymes were heat-treated at 60 °C for 20 min, cooled in ice-bath for 20 min and in room temperature for 5 min. Their residual enzymatic activities were also measured by 96 MTPs screening using pNPP. Then, residual activity value of each mutant was compared to that of its initial activity, and the ratio was remarked as Y axis of solid line.

6.25%的突变子热稳定性提高，酶活保留出发菌株的 80%以上。剩余的菌株都是负突变。以上结果表明，热稳定性的提高对酶活影响不大。

2.4 热稳定性突变株的初筛与复筛结果

实验共经过 2 轮易错 PCR，突变文库容量均约为 5 000 株突变株左右。每轮筛选得到的突变株及其包含的氨基酸突变位点如下表。

以 Fast-blue RR 顶层琼脂显色进行初筛，第一轮得到目的突变体 2 个，共包含 3 个突变位点(S234F，P168L，V329A)；第二轮得到目的突变体 4 个，共包含 8 个突变位点，其中有 6 个由第二轮易错 PCR 新引入(D182Y，A230F，A129S，K219D，N366D，L180H)。

2.5 突变脂肪酶的酶学性质研究

2.5.1 突变酶的分离纯化结果

对各突变酶进行纯化，纯化结果如图 3 (以 ep2-4 的纯化蛋白质电泳图为例)。纯酶的蛋白质分子量大小为 37 kDa。

2.5.2 突变酶的最适 pH、pH 稳定性和最适温度

利用 pNPP 法对突变酶的最适 pH、pH 稳定

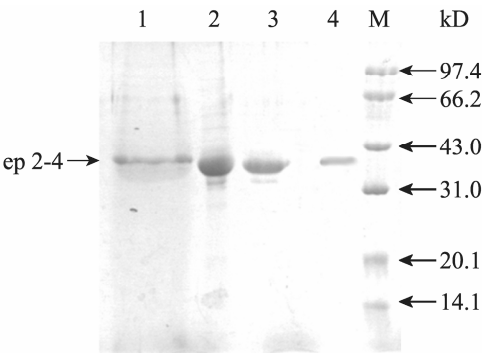


图 3 突变酶 ep2-4 的纯化结果

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified mutant ep2-4. 1: culture supernatants; 2: treated with 10 kDa membrane; 3: treated with SP-Sepharose chromatography; 4: treated with Phenyl-Sepharose FF chromatography; M: protein ladder.

性和最适温度进行测定。结果表明，相对原始酶 r27RCL，各突变酶的最适 pH、pH 稳定性和最适温度几乎都未发生变化。

2.5.3 突变酶的热稳定性

测定以上各轮突变酶在 60 ℃下的半衰期 $t_{1/2}$ 和各突变酶的 T_{50} 值。

2.5.4 突变酶 ep2-4 在 60 ℃下的热稳定性及温度对 Ep2-4 的影响

考察原始酶 r27RCL 和最优突变酶 ep2-4 的热稳定性及温度对 Ep2-4 的影响。

如上图所示，将纯化后的原始酶 r27RCL 和最优突变酶 ep2-4 于 20~80 ℃温度范围内处理 30 min 后，测定其残余酶活。r27RCL 在 45 ℃下放置 30 min 后，酶活丧失 50%；50 ℃下放置 30 min 后，酶活仅存 20%。而突变酶 ep2-4 于 55 ℃下放置 30 min 后，酶活可保存 53%；60 ℃下放置 30 min 后，还残存 30%的酶活。

将纯化后的原始酶 r27RCL 和最优突变酶 ep2-4 于 60 ℃下处理不同时间，如上图所示，

表 2 易错 PCR 得到的突变株及其氨基酸突变位点
Table 2 Lineage of variants and amino acid substitutions by error-prone PCR

	Variant	Amino acid substitution
The 1 st round error-prone PCR	Ep1-1	<u>S234F</u>
	Ep1-26	<u>P168L/V329A</u>
	Ep2-3	S234F/ <u>D182Y/A230T</u>
The 2 nd round error-prone PCR	Ep2-4	P168L/V329A/ <u>A129S</u>
	Ep2-9	V329A/ <u>N366D/L180H</u>
	Ep2-22	S234F/V329A/ <u>K219D</u>

The underlined amino acid substitutions were newly introduced by each generation.

表 3 原始酶和各轮突变酶在 60 °C 下的半衰期及 T_{50} Table 3 Half-lives (60 °C) and T_{50} of variants of each generation compared with that of r27RCL

Generation	Variant	$t_{1/2}$ (min, 60 °C)	Fold improvement	T_{50} (°C)	ΔT_{50} (°C)
0	r27RCL	4	1	45.0	0
1	Ep1-1	9.8±0.5	2.4±0.1	48.9±0.3	3.9±0.3
	Ep1-26	8.7±0.4	2.2±0.1	47.1±0.1	2.1±0.1
2	Ep2-3	11.3±0.6	2.8±0.2	51.2±0.4	6.2±0.4
	Ep2-4	21.7±0.4	5.4±0.1	52.8±0.2	7.8±0.2
	Ep2-9	13.5±0.5	3.4±0.1	51.5±0.3	6.5±0.3
	Ep2-22	16.4±0.3	4.1±0.1	52.0±0.5	7.0±0.5

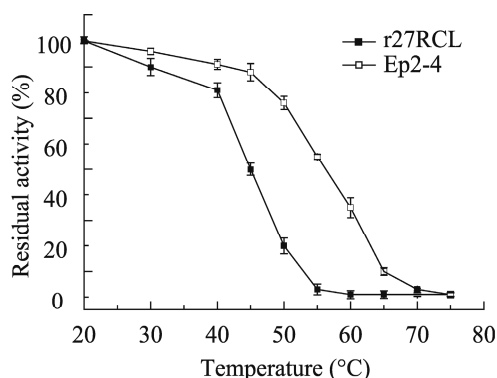


图 4 温度对 r27RCL 和 Ep2-4 稳定性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the stability of r27RCL and Ep2-4. Enzymes were incubated for 30 min at the increasing temperatures, after which residual activities were determined taking pNPP as substrate. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

r27RCL 在 4 min 内丧失 50% 的酶活, 10 min 后丧失全部酶活。而突变酶 Ep2-4 在 60 °C 下处理 21 min 还保留 50% 的酶活, 处理 50 min 后才丧失全部酶活。在高温下, Ep2-4 的稳定性有了显著提高。

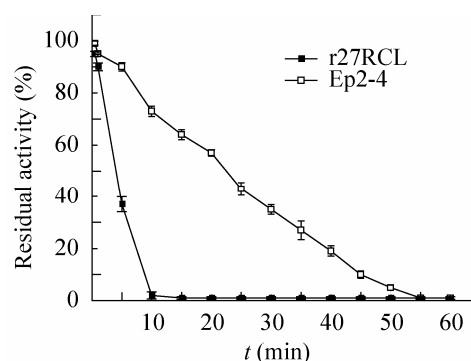


图 5 r27RCL 和 ep2-4 在 60 °C 下的热稳定性

Fig. 5 Thermostability of the r27RCL and Ep2-4 at 60 °C. Enzymes were heated at 60 °C for increasing times, after which residual activities were determined taking pNPP as substrate. The error bars show standard deviations calculated for three replicate experiments.

表 4 原始酶 r27RCL 和突变酶 ep2-4 的动力学参数
Table 4 Kinetic parameters of the parent and ep2-4

Enzymes	K_m (mmol/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mol ⁻¹ ·s ⁻¹)
r27RCL	0.304±0.0067	18.9±0.36	6.22×10 ⁴
ep2-4	0.315±0.0059	19.4±0.45	6.15×10 ⁴

2.5.5 酶动力学分析

考察原始酶 r27RCL 和突变酶 ep2-4 的动力学参数。

以 *p*NPP 为底物检测测定 r27RCL 和 ep2-4 的酶动力学参数。如上表, 突变酶 Ep2-4 对于底物的亲和性比 r27RCL 下降了 3.6%, 转化数上升了 2.6%, 总体的转化效率几乎保持不变, 即突变酶的酶活没有受到影响。

2.6 突变脂肪酶的结构模拟与突变位点分析

众所周知, 单个突变位点对酶热稳定性提高的作用难以精确解释, 因为可以同时影响酶热稳定性的结构因素较多, 单个因素的影响又很微小, 而它们的综合影响却很巨大。目前, r27RCL 的晶体结构还没有报道, 以与其具有较高同源性的 *R. niveus* 的脂肪酶的结构为模板, 对原始酶 r27RCL 的结构进行同源建模, 研究突变位点对酶热稳定性可能产生的影响。

对突变脂肪酶 Ep2-4 的三维结构进行模拟, 如图 6, 3 个氨基酸突变位点 (A129S、P168L 和 V329A) 显示为红色, 其中 A129S 和 P168L 位于蛋白质结构表面, 远离酶的催化中心 (S265-D324-H377)。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的^[18-19]。V329A 在蛋白质内部, 与活性中心接近。

突变 A129S 位于蛋白质表面一个 α 螺旋的尾端, 该突变可能是通过增加蛋白质的亲水性和极性来提高酶的热稳定性^[20]。另一个推测是突变后的 Ser129 可能会与 Gln136 中的氨基形成氢键, 从而增强蛋白质表面的稳定性^[21-22]。突变前, Ala129 和 Gln133 在空间上没有重叠区域; 突变后, Ser129 和 Gln133 在空间上出现重叠区域, 且 Ser129 带有的羟基中的氧与 Gln133 带有的酰

胺基中的氢原子间距离为 3.08 Å (图 7), 可以形成强度中等的氢键。

突变 P168L 位于蛋白质表面连接 α 螺旋和 β 转角的 loop 上, 由 Pro 突变成了疏水性更强的 Leu (图 8)。突变前, Pro168 和邻近的 α 螺旋上 Leu164 在空间上没有重叠区域 (图 8A), 而突变后, Leu168 和 Leu164 在空间上出现重叠区域, 推测 Leu168 和 Leu164 形成疏水键, 从而增加了脂肪酶表面的疏水性, 提高了酶的热稳定性^[23-24]。

突变 V329A 位于蛋白质内部, 与活性中心接近。Val 突变为 Ala, 会使蛋白质疏水性降低, 可能会影响酶活。但是酶动力学参数表明, 该突变对酶活几乎没有产生影响。目前尚不了解该突变位点对热稳定性的影响, 还需要进一步的研究才能得出结论。

以上的位点对热稳定性所起的作用均为推测分析, 需要后续的研究来确定分析的准确性。

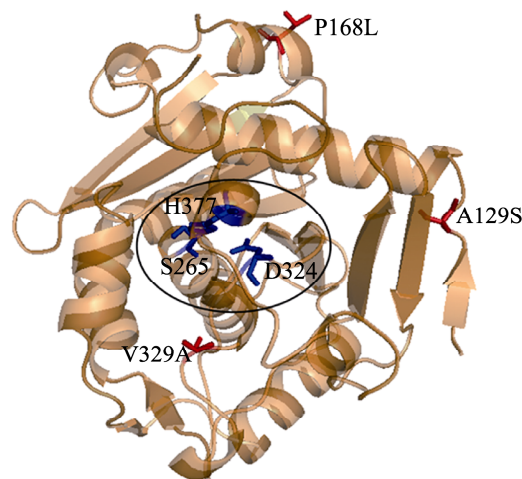


图 6 突变华根霉脂肪酶 Ep2-4 的三维结构模拟
Fig. 6 Simulated three-dimensional structure of mutant *Rhizopus chinensis* lipase Ep2-4. The three amino acid substitutions (A129S, P168L, V329A) in Ep2-4 were shown in red sticks and the catalytic residues were shown in blue sticks (in the oval).

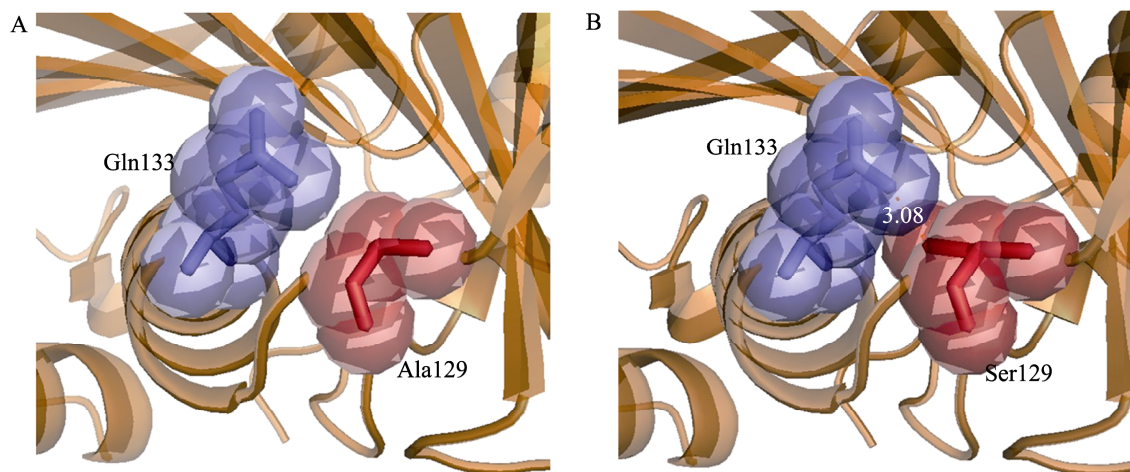


图 7 位点 129 突变前 (A) 后 (B) 三维结构模拟

Fig. 7 Simulated three-dimensional structure prior (A) and after (B) residue 129 mutation. The red part was residue Ala129 (A) and Ser129 (B), the blue part was the nearby Gln133, forming hydrogen bond with Ser129.

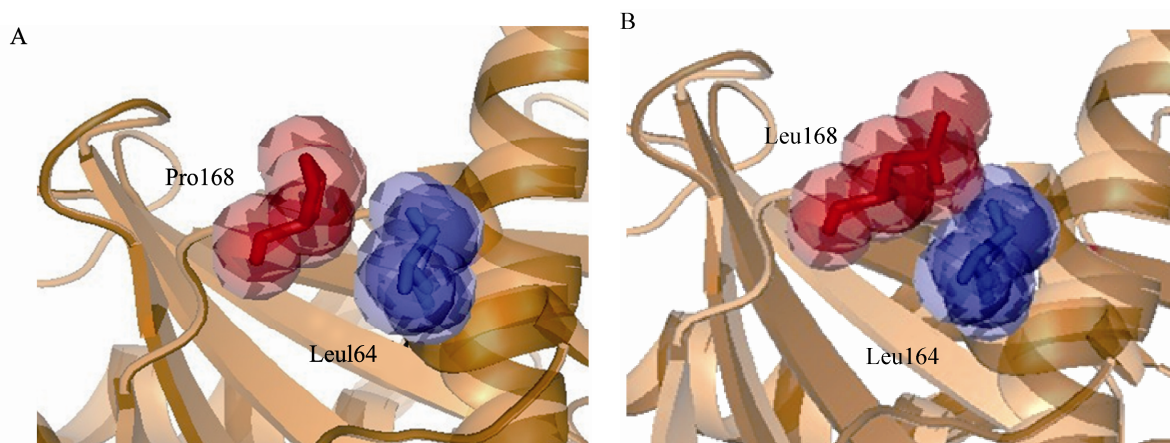


图 8 位点 168 突变前 (A) 后 (B) 三维结构模拟

Fig. 8 Simulated three-dimensional structure prior (A) and after (B) residue 168 mutation. The red part was residue Pro168 (A) and Leu168 (B), the blue part was the nearby Leu164, forming hydrophobic bond with Leu168.

3 讨论

易错 PCR 通过控制 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 dNTP 浓度来控制突变率。一般来说, 控制合适的突变率为 0.5%~2%^[25] 之间。这样可以保证在获得有效突变子的同时, 保证酶其他方面的能力。有报道

表明, 酶热稳定性提高通常要以损失酶活为代价^[26-27]。但是本文通过对整个突变库中突变子酶活和热稳定性关系的研究发现, 97% 的突变子可以保持 70% 以上的酶活, 可以筛选到热稳定性大幅提高、仍保持原有催化水平的突变株。

本文经过 2 轮易错 PCR, 获得了 60 °C 下半

衰期提高 2.5 倍的突变株, 此突变株包含 3 个氨基酸突变位点。为了考察这 3 个突变位点单独作用时对热稳定的影响, 及其组合后是加和还是协同作用, 需构建这 3 个突变位点的单突变体和双突变体, 才能精确分析各突变位点的作用。在此基础上, 再利用 DNA shuffling 或理性设计来进一步提高酶的热稳定性。

另外, 可以将突变酶进行纯化结晶, 利用 X-ray 来进行酶结构分析和模拟。由此可以较为准确地分析出各突变位点对热稳定性的影响, 为进一步改造酶的性质提供理论依据。

REFERENCES

- [1] Takahashi S, Ueda M, Atomi H, et al. Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. J Ferment Bioeng, 1998, 86(2): 164–168.
- [2] Patel RN. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug. Biomol Eng, 2001, 17(6): 167–182.
- [3] Mukherjee KD. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. Biocatalysis Biotransformation, 1990, 3(4): 277–293.
- [4] Gandhi NN. Applications of lipase. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(6): 621–634.
- [5] 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 Mol Catal B: Enzym, 18(1): 29–37.
- [6] Yasohara Y, Kizaki N, Miyamoto K, et al. Enzymatically enantioselective hydrolysis of prochiral 1,3-diacyloxyglycerol derivatives. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(9): 2044–2049.
- [7] Yu XW, Wang LL, Xu Y. *Phizopus chinensis* lipase: gene cloning, expression in *Pachia pastoris* and properties. J Mol Catal B: Enzym, 2009, 57(1/4): 304–311.
- [8] Wang TC, Yu XW, Xu Y. Expression of *Rhizopus chinensis* lipase induced by different temperatures and stability of recombinant protein. Ind Microbiol, 2010, 40(4): 34–39 (in Chinese).
王同春, 喻晓蔚, 徐岩. 诱导温度调控华根霉 (*Rhizopus chinensis*) 前导肽脂肪酶的表达及稳定性研究. 工业微生物, 2010, 40(4): 34–39.
- [9] Kamiya N, Ogawa T, Nagamune T. Enhancement of apparent thermostability of lipase from *Rhizopus* sp. by the treatment with a microbial transglutaminase. Biotechnol Lett, 2001, 23(19): 1629–1632.
- [10] Niu W, Li Z, Tan T. Secretion of pro-and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins. Mol Biotechnol, 2006, 32(1): 73–81.
- [11] 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. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(5–6): 421–430.
- [12] Beer HD, McCarthy JEG, Bornscheuer UT, et al. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*. Biochim Biophys Acta, 1998, 1399(2): 173–180.
- [13] Kohno M, Enatsu M, Funatsu J, et al. Improvement of the optimum temperature of lipase activity for *Rhizopus niveus* by random mutagenesis and its structural interpretation. J Biotechnol, 2001, 87(3): 203–210.
- [14] Niu WN, Li ZP, Zhang DW, et al. Improved thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus arrhizus* lipase by directed evolution. J Mol Catal B: Enzym, 2006, 43(1/4): 33–39.
- [15] Wang R, Yu XW, Xu Y, et al. Construction of high-quality gene mutant pool in *Pichia pastoris* by a PCR dependent method. Chin J Biotech, 2011, 27(9): 1326–1336 (in Chinese).
王睿, 喻晓蔚, 徐岩, 等. PCR 依赖型方法构建高质量酵母基因突变文库. 生物工程学报, 2011,

- 27(9): 1326–1336.
- [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 Bacteriol*, 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. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 7745–7751.
- [18] Eijssink VGH, Bjork A, Gaseidnes S, et al. Rational engineering of enzyme stability. *J Biotechnol*, 2004, 113(1–3): 105–120.
- [19] Johannes TW, Woodyer RD, Zhao H. Directed evolution of a thermostable phosphite dehydrogenase for NAD(P)H regeneration. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(10): 5728–5734.
- [20] Li W, Zhou X, Lu P. Structural features of thermozymes. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(4): 271–281.
- [21] Eijssink VGH, Dijkstra BW, Vriend G, et al. The effect of cavity-filling mutations on the thermostability of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease. *Protein Eng*, 1992, 5(5): 421–426.
- [22] Cadwell RC, Joyce GF. Randomization of genes by PCR mutagenesis. *Genome Res*, 1992, 2(1): 28–33.
- [23] Martin A, Kather I, Schmid FX. *In-vitro* selection of high stabilized protein variants with optimized surface. *J Mol Biol*, 2001, 309: 717–726.
- [24] Martin A, Kather I, Schmid FX. Origins of the high stability of an *in vitro*-selected cold-shock protein. *J Mol Biol*, 2002, 318(5): 1341–1349.
- [25] Zumárraga M, Bulter T, Shleev S, et al. Alcalde M: *in vitro* evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. *Chem Biol*, 2007, 14(9): 1052–1064.
- [26] Fernández L, Jiao N, Soni P, et al. An efficient method for mutant library creation in *Pichia pastoris* useful in directed evolution. *Biocataly Biotransfor*, 2010, 28(2): 122–129.
- [27] Fromant M, Blanquet S, Plateau P. Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1995, 224(1): 347–353.

(本文责编 陈宏宇)