

# D190V 点突变提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的最适温度和热稳定性

吴厚军 喻晓蔚\* 沙冲 徐岩\*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学 酿酒科学与酶技术中心 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】对来源于 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 的脂肪酶进行了 D190V 定点突变, 提高该酶的最适温度和热稳定性。【方法】对毕赤酵母表达的突变酶 D190V 与野生型酶 r27RCL 进行酶学性质比较。【结果】D190V 的最适温度比 r27RCL 高 5 °C, 65 °C 下的半衰期提高了一倍, 在其他性质方面, 突变酶 D190V 与 r27RCL 基本相似。【结论】通过结构分析表明, 定点突变 D190V 提高该酶稳定性的主要原因可能在于提高了突变位点所在的  $\alpha$  螺旋的稳定性以及增强了稳定蛋白质结构的氢键作用力。

**关键词:** 定点突变, 华根霉脂肪酶, 最适温度, 热稳定性

## Improved optimum temperature and thermostability of the lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 by site-directed mutagenesis of D190V

WU Hou-Jun YU Xiao-Wei\* SHA Chong XU Yan\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] D190V mutation was introduced into the lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 by site-directed mutagenesis to improve its optimum temperature and the

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022207, 2011AA02A209, 2011AA02A210); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. JUSRP11014); 国家自然科学基金项目(No. 20802027)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; Fax: 86-510-85864112

✉: 喻晓蔚: bioyuxw@aliyun.com; 徐岩: yxu@jiangnan.com

收稿日期: 2012-12-03; 接受日期: 2013-01-25

thermostability. **[Methods]** The mutant lipase D190V and wild-type lipase r27RCL were expressed in *Pichia pastoris* and the enzymatic properties were characterized. **[Results]** The optimum temperature of D190V was 5 °C higher than that of the wild-type, and the half-life ( $T_{1/2}$ ) of D190V at 65 °C exceeded that of r27RCL by 1-fold, other enzymatic properties were similar to r27RCL. **[Conclusion]** According to the analysis of structures, the reason of improved thermostability for the variant by only an amino acid substitution D190V was probably due to the improved stability of the  $\alpha$ -helix located and the strengthened hydrogen bonding force in the protein structure.

**Keywords:** Site-directed mutagenesis, *Rhizopus chinensis* lipase, Optimum temperature, Thermostability

脂肪酶(EC 3.1.1.3)即三酯酰甘油酰基水解酶,指水解甘油三酯类底物生成不同链长的游离脂肪酸和单甘油酯或双甘油酯,同时也能催化酯合成和酯交换的一类特殊的酶。因而被广泛应用于化学、食品、制药和洗涤剂工业<sup>[1]</sup>。然而,反应通常发生在高温条件下,因此要求脂肪酶具有较高的热稳定性和最适温度。

根霉作为微生物脂肪酶的重要生产菌,目前已有超过 30 种根霉脂肪酶实现了商品化生产<sup>[2]</sup>。本研究室在前期研究中,从一株酿造浓香型大曲酒曲中筛选得到的华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCC M201021)中克隆得到其脂肪酶基因 *proRCL* (GenBank 登录号 No. EF405962),并在毕赤酵母中实现了克隆与高效表达<sup>[3]</sup>。为了加速该脂肪酶在工业生产上的应用进程,需要对其进行定向改造,以期获得酶学性质优良,尤其是热稳性高的突变酶。

近年来,随着脂肪酶晶体结构的解析和人类对蛋白质分子功效的认识不断深入,采用基因工程手段提高根霉脂肪酶稳定性的研究得到不断地发展。Kohno 等<sup>[4]</sup>构建了 *Kex2* 基因突变的表达系统,利用该系统表达的雪白根霉脂肪酶(RNL)热稳定性得到了提高。Han 等<sup>[5]</sup>通过在米黑根毛霉脂肪酶(RML)中设计了一对二硫键

并利用细胞表面展示技术使其最适温度提高了 3 °C, 60 °C 下的半衰期为野生型酶的 5 倍。Kohno 等<sup>[6]</sup>采用易错 PCR 的定向进化手段对 RNL 进行改造,筛选得到的突变酶 E218V 最适温度提高了 15 °C,并从  $\alpha$ 螺旋结构稳定性及二级结构间的相互作用两方面对其机理进行了解释。

本实验拟采用定点突变进一步提高华根霉脂肪酶的热稳定性和最适温度,为该酶的开发与应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *E. coli* JM109 和华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021 由本实验室保存,重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 由本实验室构建,巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 和载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

**1.1.2 酶和试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、PCR 试剂、DNA Ladder Marker (TaKaRa 宝生物公司),引物(上海生工生物工程技术有限公司合成),PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、Plasmid Mini Kit I (OMEGA BIO-TEK),

其余试剂均为国产或进口分析纯。

**1.1.3 培养基:** 大肠杆菌培养基 LB 和酵母培养基 YPD、BMGY、BMMY 和 YPD-G418 按“Invitrogen 公司操作手册”方法配制。

**1.2 方法**

**1.2.1 定点突变、重组表达质粒及工程菌的构建:** 以 pPIC9K-*proRCL* 为模板, 分别以 50 bp FNEW/*proRCLD190VR* 以及 50 bp RNEW/*proRCLD190VF* 为引物(引物序列见表 1), 扩增出含有突变位点的片段 A 和 B, 再用重叠延伸 PCR 法<sup>[7]</sup>扩增出突变基因 *proRCLD190V*。PCR 扩增产物经 DNA 纯化试剂盒纯化后, 限制性内切酶 *Not* I 和 *Avr* II 分别对 PCR 扩增产物和质粒 pPIC9K 进行双酶切, T4 DNA 连接酶连接过夜后, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 涂布于 LB (含 100 mg/L 的 Amp) 平板, 筛选出重组菌落, 提取重组质粒 pPIC9K-*proRCLD190V* 进行序列测定。

将重组质粒 pPIC9K-*proRCLD190V* 经限制性内切酶 *Sal* I 线性化后, 电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 筛选出重组菌株。电转化及筛选方法参见 Invitrogen 公司操作手册。

**1.2.2 脂肪酶的表达与纯度分析:** 将重组菌株接种至 25 mL BMGY 培养基中, 30 °C 振荡培养 16–20 h 至 *OD*<sub>600</sub> 为 2–6, 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体并重悬于 100 mL BMMY 培养基中, 每隔 24 h 添加 1% 的甲醇诱导表达, 培养 3–4 d 后, 发酵液于 4 °C、8 000 r/min 离心 30 min

取上清作为粗酶液。毕赤酵母表达分泌的华根霉脂肪酶为加工过的前导肽保留了 27 个氨基酸的脂肪酶, 故命名为 r27RCL。

配制 SDS-PAGE 凝胶, 其中浓缩胶浓度为 2.5%, 分离胶浓度为 12%, 加样量为 20 μL。将粗酶液进行电泳检测, Quantity One 软件观察并分析蛋白纯度。

**1.2.3 酶活力测定:** 脂肪酶活力测定以对硝基苯酚棕榈酸酯(*p*NPP)为底物, 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, 方法参见文献[3]。

**1.2.4 酶学性质研究:** 将突变酶与野生型酶进行酶学性质的比较研究, 包括酶的最适温度和热稳定性、最适 pH 和 pH 稳定性、酶动力学性质。*k*<sub>cat</sub> 和 *K*<sub>m</sub> 值的测定采用双倒数作图法, 底物浓度范围是 0.238–5.088 mmol/L。配制 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH 5.0–5.5)、0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.0–8.0)、0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5–9.0)和 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液(pH 9.5–10.0), 以测定脂肪酶的最适 pH。测定 pH 稳定性时, 将 0.25 U 的酶液分别加在上述不同 pH 的缓冲液中, 于 25 °C 保温 1 h 后, 标准条件下测定酶活。测定最适温度时, 将 0.25 U 酶液分别于 20 °C–50 °C 测定酶活。测定热稳定性时, 将 0.25 U 酶液分别保温于 20 °C–65 °C 1 h, 在冰上静置 20 min 后标准条件下测定脂肪酶酶活。测定 65 °C 酶的热稳定性时, 将酶液保温于 65 °C, 每隔 2 min 取出部分酶液冰上静置 20 min, 标准条件下测定酶活。

**1.2.5 同源建模和序列比较:** 利用同源建模法 (SWISS-MODEL) 对出发脂肪酶进行结构建模<sup>[8]</sup>, 利用 DNAMAN 软件对脂肪酶氨基酸序列进行比对, 计算机软件 Discovery Studio 3.1 viewer 对酶三级结构进行观察与分析。

表 1 定点突变所用引物 Table 1 Primers for site-directed mutagenesis	
引物名称 Primers name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
50 bp FNEW	AAAGAAGAAGGGGTATCTCTC
<i>proRCLD190VR</i>	TTCCGGTGCTAACAACGTAGTAAG
50 bp RNEW	CCCAACTTGAAGTGAAGGAAC
<i>proRCLD190VF</i>	TTACTACGTTGTTAGCACCGGAA

## 2 结果与分析

### 2.1 突变位点的确定和脂肪酶表达分析

对华根霉脂肪酶 r27RCL 进行同源搜索比对,发现其三级结构与来自 *R. niveus* 的脂肪酶 (PDB 登录号 1LGY, GenBank 登录号 No. AB013496) 结构同源性最高,为 81% (图 1),确定以 1LGY 为模板酶进行同源建模。将华根霉脂肪酶 r27RCL (GenBank accession No. EF405962)<sup>[3]</sup>和雪白根霉脂肪酶 RNL<sup>[6]</sup>进行氨基酸序列比对(图 2, 比对序列为成熟肽氨基酸序列),相似度为 82%。Kohno 等<sup>[6]</sup>筛选获得的热稳定性突变酶中存在一个氨基酸突变位点 E218V,通过序列比对发现 RNL 的 E218 位在 r27RCL 中相应的保守序列为 D190,两个氨基酸均为酸性氨基酸,且 R 基带负电荷。而 E218 突变为 Val 后,最适温度和热稳定性均得到显著的提高,因此确定将 r27RCL 的 190 位点 Asp 突变为 Val。

野生型酶 r27RCL 和突变酶 D190V 发酵上清液样品通过 SDS-PAGE 检测,图 3 显示各样品均呈现一条 37 kD 的主要条带,Quantity One

分析目标酶蛋白 r27RCL 和 D190V 含量分别为 93%和 91%。

### 2.2 突变酶和野生型酶的酶学性质比较

**2.2.1 酶的最适温度和温度稳定性:**如图 4 所示,突变酶 D190V 最适温度为 45 °C,比野生型酶 r27RCL 的最适温度升高了 5 °C。如图 5 所示,35 °C 以内 r27RCL 和 D190V 温度稳定性相近,温度高于 40 °C 时 D190V 热稳定性要高于 r27RCL。温度高于 45 °C 时酶活迅速下降,65 °C 保温 1 h 均失去活性。如图 6 所示, r27RCL 半衰期为 2 min,而 D190V 的则延长为 4 min,保温 8 min 后, r27RCL 几乎失去活性,此时 D190V 仍有 20.7%的残余酶活。

**2.2.2 酶的最适 pH 和 pH 稳定性:**如图 7 所示,野生型酶 r27RCL 和突变酶 D190V 的最适 pH 均为 8.0,在 pH 7.5–8.5 的范围内,酶活均可保持在 80%以上。当 pH>8.5 时, r27RCL 酶活迅速下降, D190V 酶活下降缓慢, pH 9.5 时, r27RCL 残余酶活为 56.4%,而此时 D190V 仍保留 65.6%的酶活。如图 8 所示, r27RCL 和 D190V 在 pH 稳定性方面差别不大, D190V 的 pH 稳定性稍高于 r27RCL。

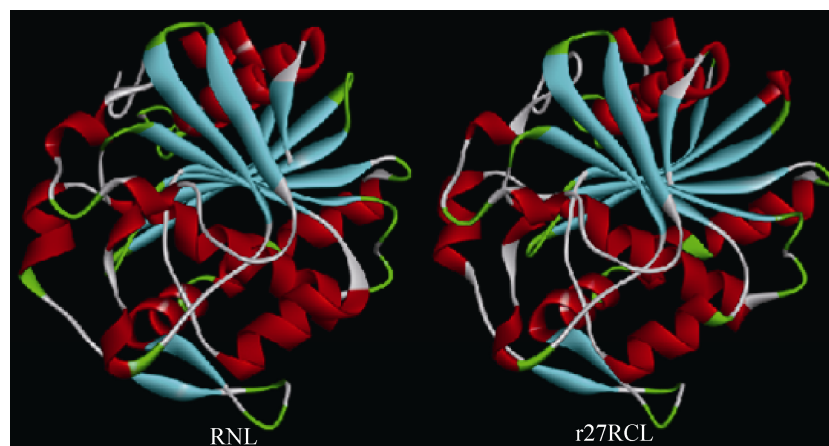


图 1 r27RCL 与 RNL 三级结构模拟图

Fig. 1 Simulated three-dimensional structures of r27RCL and RNL

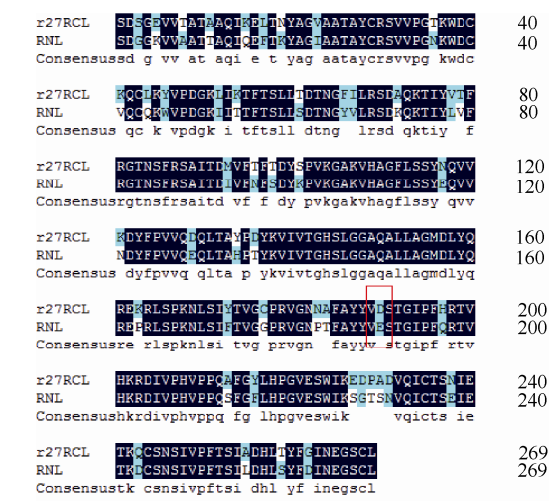


图2 r27RCL 与 RNL 氨基酸序列比对  
Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of r27RCL and RNL

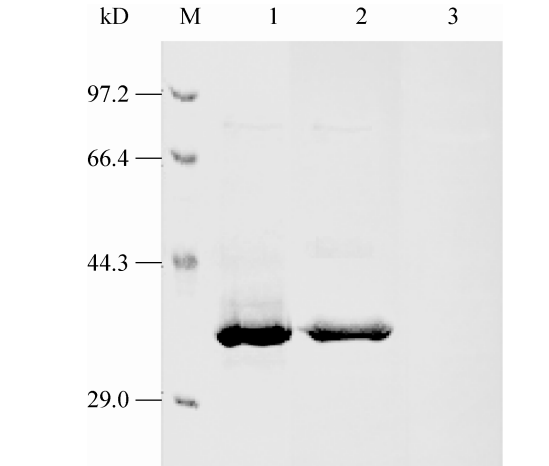


图3 脂肪酶 r27RCL 和 D190V SDS-PAGE 电泳图  
Fig. 3 SDS-PAGE of r27RCL and D190V  
Note: 1: r27RCL; 2: D190V; 3: Blank control.

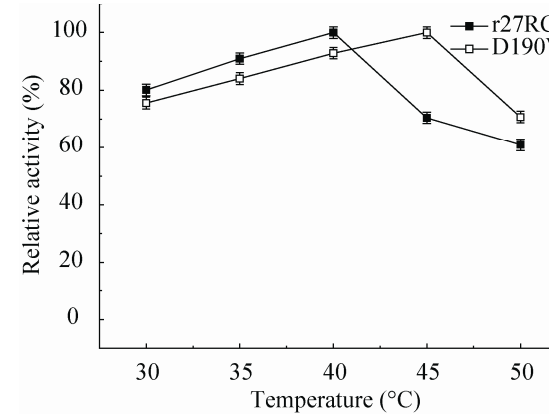


图4 温度对 r27RCL 和 D190V 活力的影响  
Fig. 4 Effect of temperature on the activity of r27RCL and D190V

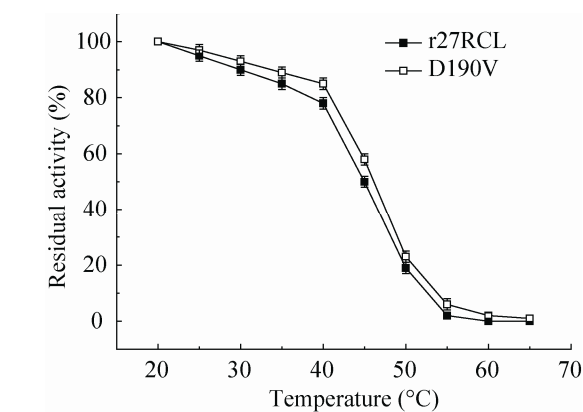


图5 温度对 r27RCL 和 D190V 稳定性的影响  
Fig. 5 Effect of temperature on the stability of r27RCL and D190V

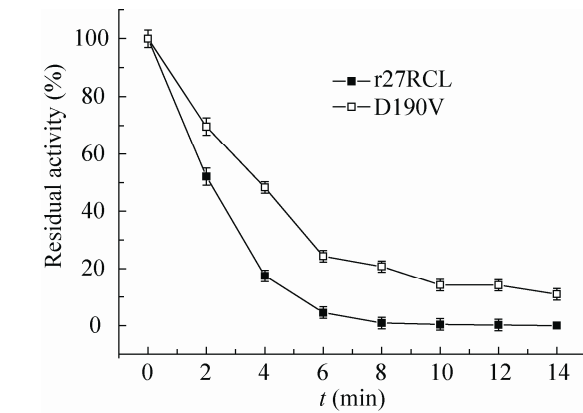


图6 r27RCL 和 D190V 在 65 °C 下的热失活曲线  
Fig. 6 The thermal inactivation profiles of r27RCL and D190V at 65 °C

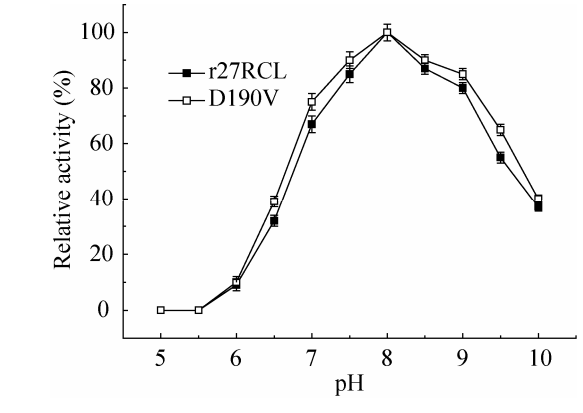


图7 pH 对 r27RCL 和 D190V 活力的影响  
Fig. 7 Effect of pH on the activity of r27RCL and D190V

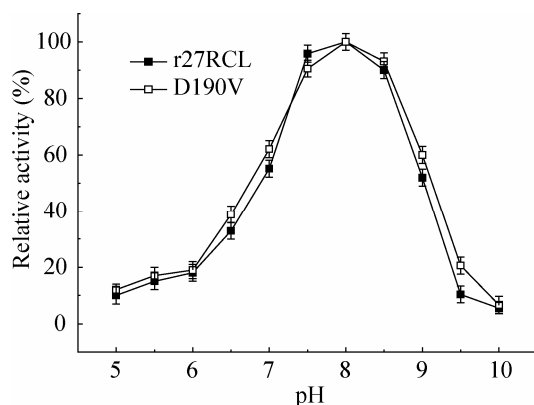


图8 pH对r27RCL和D190V稳定性的影响

Fig. 8 Effect of pH on the stability of r27RCL and D190V

**2.2.3 酶的动力学分析:** r27RCL和D190V动力学参数见表2。可见突变后脂肪酶的 $K_m$ 值下降了23.3%,由原来的0.304 mmol/L下降为0.233 mmol/L。 $K_m$ 值的下降表明突变酶D190V对底物的亲和力提高;突变后脂肪酶的 $k_{cat}$ 值略有下降, $k_{cat}/K_m$ 值基本不变,说明突变后催化效率未受到影响。

表2 r27RCL和D190V的动力学参数			
Table 2 Kinetic parameters of r27RCL and D190V			
Enzyme	$k_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mmol/L)	$k_{cat}/K_m$ [ $L/(mol \cdot s)$ ]
r27RCL	18.9	0.304	$6.22 \times 10^4$
D190V	14.3	0.233	$6.14 \times 10^4$

### 3 讨论

本实验通过单一氨基酸位点突变成功提高了华根霉脂肪酶的热稳定性和最适温度。有两个假设可能解释该现象。第一个假设是 $\alpha$ 螺旋的稳定,该突变位点(D190V)位于 $\alpha$ 螺旋上(图9),由于疏水作用对于 $\alpha$ 螺旋的稳定很关键,所以亲水氨基酸Asp(D)替换成疏水氨基酸Val(V)后,很可能增强了螺旋内部疏水侧链的相互作用。在此螺旋中,从Ala184位点到Val189位点的6个氨基酸均为疏水性氨基酸,Asp替换成Val后,相邻的原本不在此螺旋上的Ser191也加入了该螺旋结构中,这可能提高了螺旋内部的疏水相互作用,结果使 $\alpha$ 螺旋变得稳定,酶的热稳定性得到了提高。

第二个假设是稳定蛋白质结构作用力的增强。如图10所示,在野生型酶中,Asp190的酰胺氢只与Ala186的羰基氧之间形成一对氢键(Asp190:HN-Ala186:O)。当Asp突变成Val后,Val190的酰胺氢不仅与Ala186的羰基氧之间形成氢键(Val190:HN-Ala186:O),还与Tyr187的羰基氧形成了新的氢键(Val190:HN-Tyr187:O),而蛋白质的热稳定性与氢键数量呈正相关<sup>[9]</sup>,这可能是突变酶D190V最适温度和热稳定性提高的另一因素。

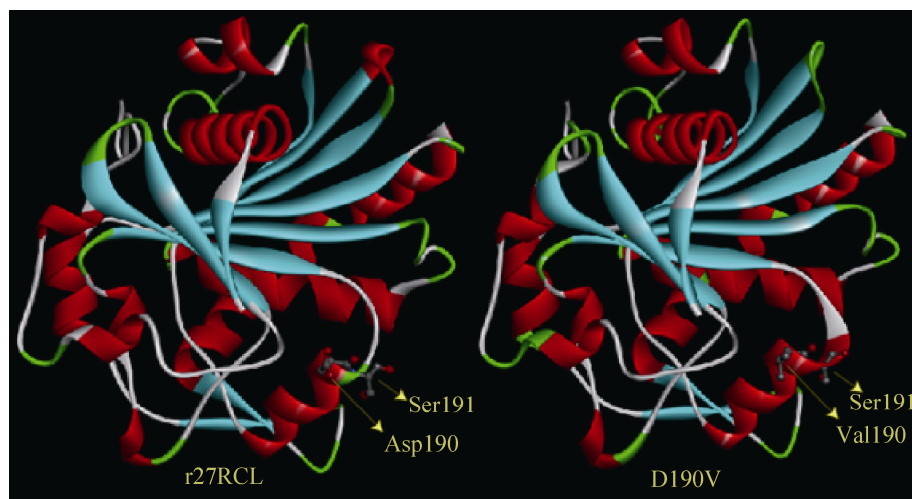


图9 r27RCL和D190V三维结构模拟图

Fig. 9 Simulated three-dimensional structures of r27RCL and D190V



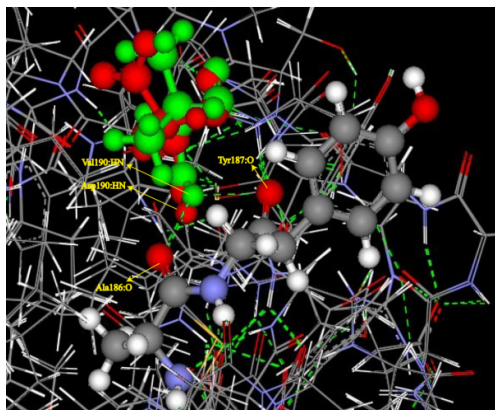


图 10 r27RCL 和 D190V 局部结构图

Fig. 10 Localized r27RCL and D190V structures

综上所述, 通过单一氨基酸位点的定点突变提高了华根霉脂肪酶的热稳定性和最适温度, 不仅为研究脂肪酶结构与功能的关系提供了数据, 而且也为更好的开发与利用华根霉脂肪酶奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases[J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19(8): 627–662.
- [2] Haas M, Joerger RD. Food biotechnology: microorganisms[M]. New York: VCH Publishers, Inc., 1995: 549–588.
- [3] Yu XW, Wang LL, Yan X. *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 57(1/4): 304–311.
- [4] Kohno M, Enatsu M, Takee R, et al. Thermal stability of *Rhizopus niveus* lipase expressed in a kex2 mutant yeast[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 81(2/3): 141–150.
- [5] Han ZL, Han SY, Zheng SP, et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 85(1): 117–126.
- [6] 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]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 87(3): 203–210.
- [7] Steffan NH, Henry DH, Robert MH, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. *Gene*, 1989, 77(1): 51–59.
- [8] Kiefer F, Arnold K, Künzli M, et al. The SWISS-MODEL repository and associated resources[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D387–D392.
- [9] Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 269(4): 631–643.