

研究报告



理性设计提高酯合成催化反应脂肪酶的热稳定性

温露文 徐岩 喻晓蔚*

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

摘要:【背景】南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) 具有优异的酯合成活性, 是在非水相催化中应用极为广泛的工业用酶。【目的】在保留 CALB 优秀催化性能的基础上, 提高 CALB 的热稳定性。【方法】采用预测软件 PoPMuSiC 和 FoldX 计算 CALB 潜在热稳定性突变位点, 并根据氨基酸残基的空间位置进一步筛选。利用重叠延伸 PCR 技术在基因 *calb* 中引入 10 个单点突变, 于毕赤酵母 GS115 中表达。【结果】点突变 A146G、A151P、L278M 均能有效提高 CALB 的热稳定性。在单点突变的基础上, 组合突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的热稳定性得到进一步提高。与野生型相比, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的最适反应温度均提高了 5 °C, T_m 值分别提高了 3.3 °C 和 4.2 °C。此外, 合成己酸乙酯的酶促反应动力学分析表明, 相比于野生型, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 对己酸和乙醇均具有更高的亲和力, 且对己酸的催化效率 k_{cat}/K_m 是野生型的 4.1 倍。通过分子动力学模拟, 从分子水平阐明了突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 热稳定性提高的机制。【结论】本研究采用的理性设计策略对提高 CALB 的热稳定性是行之有效的, 该策略可作为其他工业用酶提高热稳定性的参考。

关键词: 南极假丝酵母脂肪酶 B, 热稳定性, PoPMuSiC, FoldX

Rational design to improve lipase thermostability for ester synthesis

WEN Lu-Wen XU Yan YU Xiao-Wei*

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

Abstract: [Background] *Candida antarctica* lipase B (CALB) exhibits excellent ester synthesis activity and is used widely in biochemical synthesis. [Objective] This study aimed to improve the thermostability of CALB based on retaining its excellent catalytic performance. [Methods] The potential thermostability mutation sites of CALB were calculated by the prediction software PoPMuSiC and FoldX, and further selected according to the spatial position of amino acid residues. Ten single point mutations were introduced into gene *calb* via the overlap extension PCR and expressed in *Pichia pastoris* GS115. [Results] The point mutations A146G, A151P and L278M could effectively improve the thermostability of

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

*Corresponding author: Tel: 86-510-85918201; E-mail: yuxw@jiangnan.edu.cn

Received: 12-10-2019; Accepted: 13-02-2020; Published online: 30-04-2020

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: 0510-85918201; E-mail: yuxw@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2019-10-12; 接受日期: 2020-02-13; 网络首发日期: 2020-04-30

CALB. Based on single point mutations, the thermostability of the combined mutants A146G-L278M and A146G-L278M-A151P was further improved. Compared with the wild-type, the optimum reaction temperature for A146G-L278M and A146G-L278M-A151P were increased by 5 °C, and the T_m value were increased by 3.3 °C and 4.2 °C, respectively. Besides, the kinetic study of the enzymatic reaction of synthesis ethyl caproate shows that mutants A146G-L278M and A146G-L278M-A151P had higher affinity to hexanoic acid and ethanol than the wild-type, and the catalytic efficiency k_{cat}/K_m to hexanoic acid was 4.1-fold over that of the wild-type. The mechanism of the thermostability of the mutants A146G-L278M and A146G-L278M-A151P were elucidated at molecular level through molecular dynamics simulation. **[Conclusion]** The rational design strategy adopted in this study is effective for improving the thermostability of CALB. This strategy can also be used as a reference for other industrial enzymes to improve their thermostability.

Keywords: *Candida antarctica* lipase B, Thermostability, PoPMuSiC, FoldX

南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)是由 317 个氨基酸构成的球状蛋白, 分子量为 33.5 kD, 是有机合成中最常用的脂肪酶之一。1994 年, Uppenberg 等^[1]解析获得了 CALB 的氨基酸序列及晶体结构, CALB 具有脂肪酶典型的催化三联体结构(Ser105-Asp187-His224), 由 Thr40 和 Gln106 形成氧负离子洞, 同时具有一个特异性底物结合口袋。CALB 作为一种重要的工业酶制剂, 相比于其他脂肪酶, 其在酯化、水解、转酯、手性化合物拆分、氨解等方面表现出更为出色的催化性能^[2]。此外, CALB 在区域选择性和对映选择性方面表现出非常高的底物选择性。因此, CALB 在食品、化工、手性药物拆分、油脂加工、生物柴油^[3-5]等行业具有广泛的应用, 然而野生型 CALB 的热稳定性差, 限制了其在工业中的应用^[6-7]。

目前已有多种策略用于提高蛋白质的热稳定性, 例如固定化^[8]、介质工程^[9]和蛋白质工程^[10]。蛋白质工程是通过改造酶分子本身提高酶的热稳定性, 蛋白质工程策略主要分为定向进化和理性设计, 以及定向进化和理性设计相结合的半理性设计策略等^[10-12]。Akbulut 等^[13]通过定向进化成功提高了短小芽孢杆菌脂肪酶的热稳定性和活性, 获得的嵌合突变体(L3-3)的比酶活分别比两个亲本酶高 6.4 倍和 8.2 倍, 且该突变体在 50 °C 下的半衰期增加了 9 倍。通过定向进化策略, Zhang 等^[14]筛

选得到两株热稳定性有所提高的 CALB 突变体 23G5 和 195F1。Wen 等^[15]通过 B-factor 迭代测试对解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2 进行半理性设计改造, 相比野生型, 获得的突变体 A103S 和 T117G 显示出更高的热力学稳定性, 50 °C 下半衰期分别提高了 2.7 倍和 5.2 倍。随着计算机运算能力的不断提升, 以及酶分子的氨基酸序列、三级结构及催化机理等被逐渐挖掘和解析, 蛋白质工程的理性设计策略越来越受到重视^[16]。与非理性和半理性策略相比, 理性设计可以提供更为准确的预测结果。共价键^[17]或非共价相互作用的引入^[18]、脯氨酸的增加或甘氨酸的减少^[19]、氨基酸序列的截短^[20]和环化^[21]等策略已用于提高蛋白质的稳定性。Zhang 等^[22]通过分子动力学模拟和脯氨酸的引入, 获得热稳定性提高的解脂耶氏酵母脂肪酶 LIP2 突变体 V213P, 该突变体的最适温度提高了约 5.0 °C, 且其催化活性与亲本相当。通过点突变和二硫键的引入, 提高了米根霉脂肪酶的热稳定性, 突变体 V209L/D262G/E190C/E238C 在 55 °C 和 65 °C 的半衰期分别是野生型的 102.5 倍和 20 倍^[23]。Damjanović 等^[24]通过删除 D40 Loop 区域提高了抗生链霉菌磷脂酶 D 的热稳定性, 缺失 Loop 区的突变体 Δ38-46 DYR 在 70 °C 的活性半衰期比 DYR 高 11.7 倍。为提高 CALB 热稳定性, Park 等^[25]采用分子动力学模拟和 RosettaDesign 算法选择 CALB 潜在的热稳定性突变位点, 最终筛选得到热稳定

性有所提高的突变体 A251E, 其在 50 °C 的半衰期提高约 2.5 倍, 但比酶活下降了一半。Kim 等^[26]结合 B-factor 值和 RosettaDesign 算法, 最后获得 T_m 值增加了 2.3 °C 的 CALB 突变体 R249L。通过选取 CALB 活性部位附近高 B-factor 值的柔性位点进行突变, Xie 等^[27]得到 T_m 值增加了 3.6 °C 的 D223G/L278M 的优势双突变体。

蛋白质解折叠自由能(ΔG)是蛋白质热力学参数中最重要的参数, 软件 PoPMuSiC^[28]和 FoldX^[29]是利用生物信息学的方法来模拟突变对蛋白质解折叠自由能(ΔG)的影响。若突变后的 ΔG (mutant)小于野生型 ΔG (wild), 表明该突变对蛋白质的热稳定性有正效应。若突变后 ΔG 增加, 则说明该突变不利于蛋白质的稳定。Kumar 等^[30]在针对 Cu/Zn 超氧化物歧化酶(SOD1)稳定性的研究中, 比较了 8 种计算蛋白质稳定性的工具, 结果表明 PoPMuSiC 和 FoldX 是最佳的计算方法。本研究采用 PoPMuSiC 和 FoldX 计算 CALB 潜在的热稳定性位点, 在保留 CALB 优良催化性能的基础上提高其热稳定性, 同时尝试筛选获得催化活力提高的突变体, 并采用分子动力学模拟进一步分析了 CALB 突变前后热稳定性变化的机制。本研究为拓宽 CALB 的工业应用提供了一定的技术支撑, 同时为解析 CALB 的热稳定性机制及进一步改造提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 JM109、毕赤酵母 GS115 及质粒 pPICZαA 均由本实验室保藏。

1.2 主要试剂

经密码子优化的 *calb* 基因、引物, Genewiz 公司; 表 1 列出了本研究所用的引物; PCR 产物纯化试剂盒, Omega 公司; 博莱霉素 (zeocin), Invitrogen 公司; DNA Marker、蛋白 Marker、限制性内切酶 *Not* I、*Eco*R I、PrimeSTAR, TaKaRa 公

表 1 用于定点突变的引物

Table 1 Primers used in site directed mutagenesis

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
<i>calb</i> -F	AATTGAATTCTTGCCATCTGGTTCTGATCCTG
<i>calb</i> -R	AATTGCGGCCGCTTAAGGAGTAACA
S50R	ATCTTTTGATAGAACTGGATTCCATTGT
S56M	GATTCCATTGATGACTCAATTGGGTTAC
Q112L	GTTTGGTTGCTTTGTGGGGTTTG
A130C	ATAGATTGATGTGTTTTGCTCCTG
A146G	TGGTCCATTGGATGGTTTGGCTGTTT
A151P	GGCTGTTTCTCCACCTTCTGTT
N181V	GTTCCAACACTACTGTTTGTACTCTGCT
G226R	TTGATCATGCTAGATCTTTGACT
N264P	CTTTGCCAGCTCCAGATTGACTCC
L278M	TGCTGCTTTGATGGCTCCAG

注: 标注下划线的碱基为突变位点, 用于定点突变的引物的正向完全互补。

Note: The underlined base is a mutation site, and the primers used for site directed mutagenesis are fully complementary in the forward and reverse.

司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Pme* I, New England Biolabs 公司。

1.3 培养基

培养基低盐 LB (+zeocin)、YPD (+zeocin)、BMGY、BMMY, 均根据 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册配制。

1.4 主要仪器

AKTA 蛋白纯化仪, GE 公司; 配备氢火焰离子化检测器的气相色谱仪, Agilent 公司; 差示扫描量热仪, Waters 公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 酶标仪, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.5 CALB 潜在热稳定性位点的预测

将已解析的 CALB 晶体结构(PDB ID: 1TCA)提交至软件 PoPMuSiC 和 FoldX 进行计算。根据软件计算的 $\Delta\Delta G$ 结果进行排序, 选择突变后 ΔG 下降幅度大的位点。此外, 采用 PyMOL 观察相应氨基酸残基在蛋白结构中的空间位置, 以防止选择的位点突变对 CALB 的酶活造成不利的影响, 以此排除一些不合理的突变位点。

1.6 定点突变及重组菌株的构建

通过酶切位点 *Not* I、*Eco*R I 酶切 *calb* 基因, 连接表达载体 pPICZαA, 构建重组质粒 pPICZαA-*calb*。以重组质粒 pPICZαA-*calb* 为模板, 根据表 1 合成相应的引物, 采用重叠延伸 PCR 技术构建各个点突变质粒。采用限制性内切酶 *Pme* I 酶切线性化重组质粒, 随后电转至毕赤酵母感受态细胞, 涂布至 YPD (+zeocin) 平板, 挑取阳性单克隆, PCR 验证, 获得重组菌株 GS115/pPICZαA-*calb* 以及相应突变菌株。

1.7 重组菌株的发酵及 CALB 的表达

将野生型(wild-type, WT)及突变重组菌株于平板 YPD (+zeocin)划线培养 2–3 d, 挑取单克隆接种 BMGY 培养基, 30 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 2.0–6.0。8 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清, 将全部菌体转移至 BMMY。将 BMMY 置于 28 °C、200 r/min 培养, 每隔 24 h 添加 1% 的甲醇诱导, 并取样测定样品的 OD_{600} 、蛋白浓度及酶活, 通过 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达情况。

1.8 CALB 的纯化

发酵结束后, 于 4 °C、8 000 r/min 离心 5 min 收集发酵液, 测定发酵液的比酶活及总蛋白含量。随后将发酵液置于 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中透析, 约透析 15 h, 并时常更换缓冲液, 直至透析液颜色由较深的黄色转变为浅淡黄色。透析结束后, 先用截留分子量为 10 kD 的超滤管浓缩透析液, 随后再用 QFF 阴离子交换柱进行纯化。由于 CALB 具有 pH 4.0–8.0 的广泛的等电区域^[31], 因此在 pH 8.0 条件下, CALB 的净电荷几乎为零, 因此 CALB 主要集中在穿透峰流出。收集穿透峰, 浓缩后测定纯酶比酶活及总蛋白含量, 计算回收率及纯化倍数。

1.9 CALB 酯合成酶活力测定方法

各吸取 200 μL 己酸/庚烷(1.2 mol/L)和乙醇/庚烷(1.2 mol/L)底物溶液, 随后加入 10 μL 的酶液, 于 45 °C、200 r/min 振荡反应 60 min。反应结束

后, 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液进行气相色谱(GC)分析, 检测产物己酸乙酯的含量。

气相色谱检测条件: 以异戊醇为内标, 色谱柱为 Econo Cap-Wax (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 初始温度 90 °C, 保持 1 min, 10 °C 升温至 200 °C, 保持 5 min, 检测器温度 225 °C, 进样器温度 225 °C。

酶活力单位 U 的定义: 在酶促反应条件下, 1 min 内生成 1 μmol 己酸乙酯所需的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。根据产物与内标峰面积之比计算产物的含量。酶活计算公式如下:

$$\text{酶活(U/mL)} = \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times S_{\text{标样}} \times V \times 10^6 \times \frac{1}{144.2} \times \frac{1}{t} \times \frac{1}{v}$$

式中, $A_{\text{样}}$: 待测样品产物与内标峰面积之比; $A_{\text{标}}$: 标品与内标峰面积之比; $S_{\text{标样}}$: 标品浓度(g/L); V : 反应液体积(L); 144.2: 己酸乙酯的摩尔质量(g/mol); t : 反应时间(min); v : 加入的酶液体积(mL)。

1.10 T_m 值的测定

将纯化得到的 CALB 置于 20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中透析过夜直到平衡。取约 1 mL 的透析液作为空白对照, 采用差示扫描量热仪测定样品的 T_m 值。

1.11 最适温度及温度稳定性的测定

将纯酶加入酶促反应体系中, 并将其置于 35、40、45、50、55、60 °C 下反应 60 min 后测定残余酶活, 确定 CALB 的最适反应温度, 以最高酶活为 100%。

将等量的纯酶液分别置于 45、50、55、60、65 °C 下孵育 60 min, 然后于 45 °C 下测定残余酶活, 以未进行孵育的酶液酶活为 100%, 测定 CALB 在不同温度下的热稳定性。

1.12 半衰期 $t_{1/2}$ 的测定

将等量的纯酶液置于 50 °C 中, 分别孵育 90、180、270、360、450、540、630 min, 随后测定残余酶活, 以未孵育的酶液酶活为 100%。以

ln(残余酶活)对孵育时间作图, 进行线性拟合, 所得斜率即为 CALB 在该温度下的失活常数 k_d 。CALB 在 50 °C 下的半衰期($t_{1/2}$)可由以下公式求得: $t_{1/2}=\ln 2/k_d$ 。

1.13 pH 稳定性的测定

配制不同 pH 的缓冲液: 20 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0–6.0), 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0–8.0), 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0–9.0)以及 20 mmol/L 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH 9.0–11.0)。将纯酶分别置于上述不同 pH 的缓冲液中处理约 17 h, 随后测定残余酶活, 以最高酶活为 100%, 测定 CALB 在不同 pH 下的稳定性。

1.14 酶促反应动力学分析

分别配制不同浓度的己酸/庚烷(0–7 mol/L)和乙醇/庚烷(0–2.4 mol/L)底物溶液。根据 1.9 的酶活测定方法, 固定其中一个底物浓度(1.2 mol/L), 改变另一个底物浓度, 测定 CALB 在不同底物浓度下的初始反应速率。采用软件 GraphPad Prism 8 对实验结果进行非线性拟合, 计算 CALB 对乙醇和己酸的 K_m 、 K_i 和 k_{cat} 值^[32]。

1.15 分子动力学模拟分析

采用软件 Gromacs 进行分子动力学模拟分析。蛋白的均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)和轨迹中原子位置的均方根涨落(root mean square fluctuation, RMSF)分别采用 gmx rms、gmx rmsf 程序计算, 分子的回旋半径(radius of gyration, R_g)则通过 gmx gyrate 程序计算。

2 结果与分析

2.1 CALB 潜在热稳定性位点的预测

综合 PoPMuSiC 和 FoldX 的计算结果, 以及氨基酸残基在蛋白结构中的空间位置, 最终选取了 10 个位点进行突变, 具体突变位点见表 2。

2.2 GS115/pPICZαA-calb 的摇瓶发酵

根据方法 1.7 进行重组菌株 GS115/pPICZαA-calb 的摇瓶发酵, 结果如图 1 所示。随着发酵时间的增加, 酶活、蛋白浓度和 OD_{600} 逐渐增加。发酵

表 2 突变氨基酸的选取

Table 2 List of mutation amino acid (AA)

工具	位点	野生型氨基酸	突变氨基酸	命名
Tool	Position	Wild-type AA	Mutation AA	Name
PoPMuSiC	130	Ala	Cys	A130C
	146	Ala	Gly	A146G
	181	Asn	Val	N181V
	264	Asn	Pro	N264P
	278	Leu	Met	L278M
FoldX	50	Ser	Arg	S50R
	56	Ser	Met	S56M
	112	Gln	Leu	Q112L
	151	Ala	Pro	A151P
	226	Gly	Arg	G226R

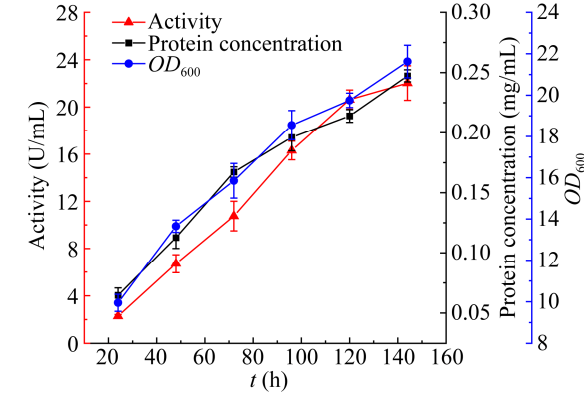


图 1 GS115/pPICZαA-calb 的摇瓶发酵曲线
Figure 1 Fermentation curves of GS115/pPICZαA-calb in shake flask

144 h 时, 蛋白浓度达到约 0.25 mg/mL, 酶活达到 22 U/mL, OD_{600} 达到 22.0。但在发酵后期, 酶活的增长有所减慢, 可能是目的蛋白在发酵后期容易降解。

2.3 CALB 的纯化

CALB 纯化前后的 SDS-PAGE 分析如图 2 所示。相较于发酵液, 纯化后的 CALB 条带单一, 纯度达到电泳纯, 说明 QFF 阴离子层析能有效地从酵母发酵液中纯化得到 CALB。经计算, 使用 QFF 阴离子层析纯化 CALB 的回收率为 32.7%, 纯化倍数为 1.54 (表 3)。

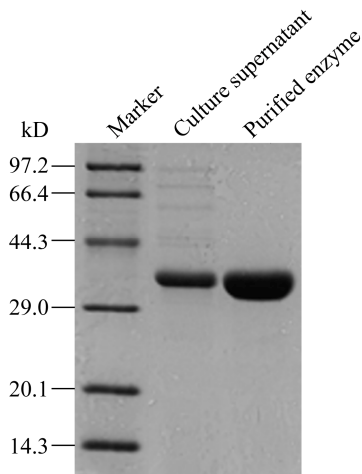


图 2 CALB 纯化前后的 SDS-PAGE 图
Figure 2 SDS-PAGE of CALB

表 3 发酵液中纯化 CALB 的数据
Table 3 Purification of CALB from the culture supernatant

纯化步骤	回收率	纯化倍数
Purification step	Activity yield (%)	Purification
发酵液 Culture supernatant	100	1.0
纯酶 Purified enzyme	32.7	1.5

2.4 有效热稳定性位点的筛选

对构建的 10 株突变菌株进行发酵并与野生型菌株进行对比。各个突变体发酵液的 SDS-PAGE 图如图 3 所示，菌株 GS115/pPICZαA-calb-S50R 和 S56M 几乎不表达目的蛋白，经测定其蛋白浓度仅为 0.05 mg/mL，因此舍弃该突变。其余突变菌株的胞外蛋白分泌量都与野生型相当，能达到 0.2 mg/mL 的表达水平。

为简化筛选步骤，首先通过测定发酵液的热稳定性初步筛选有益的突变位点。将发酵液置于 50 °C 下孵育 180 min 后测定残余酶活，以未孵育的发酵液酶活为 100%，同时测定点突变对酶活的影响，结果如图 4 所示。在 50 °C 下孵育 180 min，突变体 A146G、A151P 和 L278M 的热稳定性均有所提高，残余酶活分别是野生型的 2.0、1.5 和 2.8 倍，酶活分别为野生型的 0.77、1.2、0.97 倍。

将有效的单点突变 A146G、A151P 和 L278M 进行组合，构建得到双组合突变体 A146G-A151P、

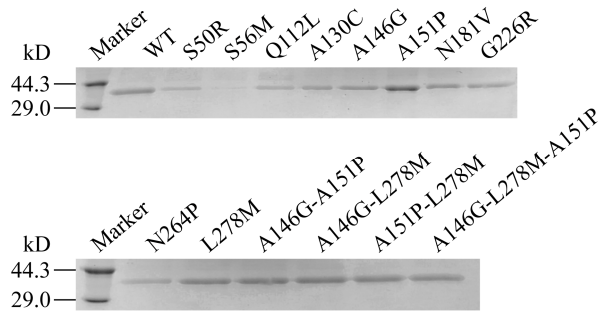


图 3 各个突变体发酵液的 SDS-PAGE 图
Figure 3 SDS-PAGE of each mutant supernatant

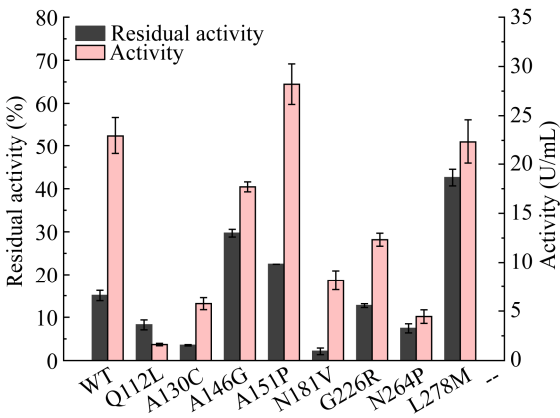


图 4 未纯化突变体及野生型的热稳定性及发酵酶活
Figure 4 Thermostability and activity of the mutants and the wild-type in the supernatant

A146G-L278M、A151P-L278M 及三组合突变体 A146G-L278M-A151P。经发酵液热稳定性和酶活的初步测定，突变体 A146G-A151P 的热稳定性和酶活均低于单点突变，因此淘汰突变体 A146G-A151P，其余组合突变体的热稳定性在单点突变的基础上均得到进一步的提高。

纯化野生型和突变体 A146G-L278M、A151P-L278M、A146G-L278M-A151P 发酵液得到相应的纯酶。测定野生型和各个突变体纯酶在 50 °C 孵育 180 min 后的残余酶活，以未孵育的酶液酶活为 100%，同时测定发酵液的酶活力，结果如图 5 所示。突变体 A146G-L278M、A151P-L278M、A146G-L278M-A151P 在 50 °C 孵育 180 min 后的残余酶活分别是野生型的 1.7、2.1、1.8 倍。突变

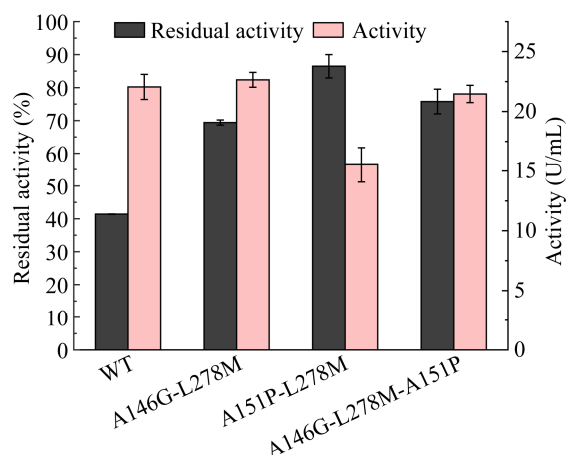


图5 突变体及野生型的热稳定性及发酵活力比较
Figure 5 Thermal stability and enzyme activity comparison of the mutants and the wild-type

后, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的发酵活力与野生型相当, 但突变体 A151P-L278M 的酯合成酶活性有所下降。因此, 下一步主要针对突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 进行研究。

2.5 T_m 值的测定

T_m 值的测定结果如图 6 所示。野生型的 T_m 值为 56.2 °C, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的 T_m 值分别为 59.5 °C 和 60.4 °C, 分别比野生型提高了 3.3 °C 和 4.2 °C。通过选取活性部位附近高 B-factor 值的柔性位点进行突变, Xie 等^[27]将 CALB 的 T_m 值提高了 3.6 °C, 二硫键的引入也将 CALB 的 T_m 值提高了 1.1 °C^[6]。此外, Kim 等^[26]结合 B-factor 值和 RosettaDesign 算法获得了 T_m 值增加了 2.3 °C 的 CALB 突变体。

2.6 最适温度及温度稳定性的测定

最适温度和温度稳定性的测定结果分别如图 7 和图 8 所示。由图 7 可以看出, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的最适反应温度为 50 °C, 比野生型的最适温度提高了 5 °C; 当温度继续升高时, 野生型和突变体的酶活均显著下降, 但两个突变体在高温下的酶活高于野生型。由图 8 可以看出, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-

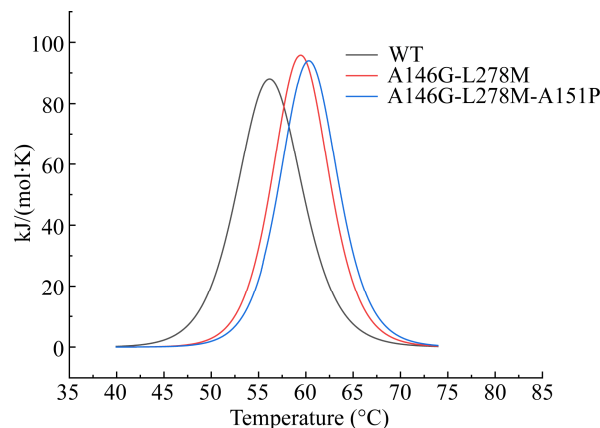


图6 突变体及野生型的差示扫描量热分析结果
Figure 6 Differential scanning calorimetric analysis of the mutants and the wild-type

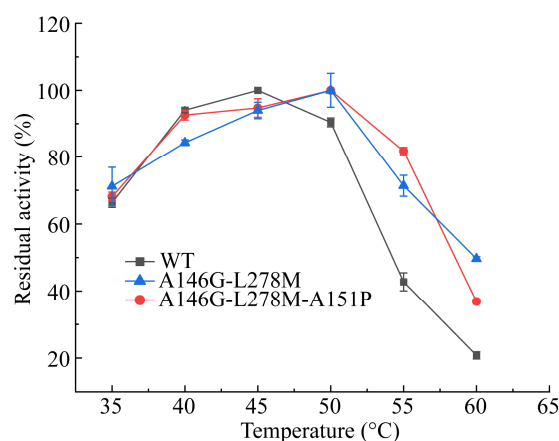


图7 突变体和野生型的最适反应温度
Figure7 Effects of temperature on the activity of the mutants and the wild-type

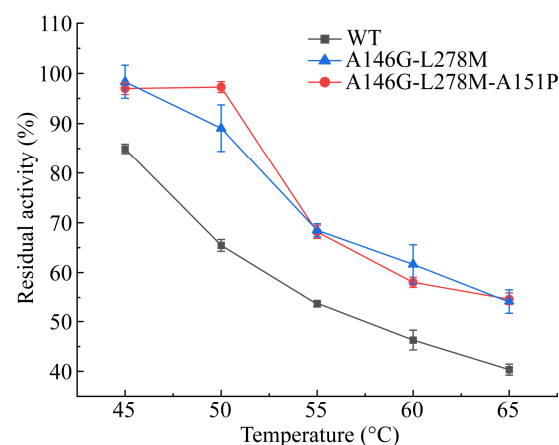


图8 突变体和野生型的温度稳定性
Figure 8 Effects of temperature on the stability of the mutants and the wild-type

L278M-A151P 在不同温度下孵育 60 min 后, 热稳定性高于野生型; 在 50 °C 孵育 60 min 后, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的残余酶活分别是野生型的 1.36 倍和 1.49 倍。

2.7 半衰期 $t_{1/2}$ 的测定

将样品置于 50 °C 下孵育不同时间测定残余酶活, 以 $\ln(\text{残余酶活})$ 对时间作图, 结果如图 9 所示。根据方法 1.12 中的公式, 计算得知野生型的半衰期 $t_{1/2}$ 为 279 min, 突变体 A146G-L278M 的半衰期 $t_{1/2}$ 为 377 min, A146G-L278M-A151P 的半衰期 $t_{1/2}$ 为 418 min, 分别是野生型的 1.35 倍和 1.5 倍。Park 等^[25]通过点突变成功提高了 CALB 的半衰期, 突变酶 A251E 在 50 °C 下的半衰期 (251 min) 是野生型 (100 min) 的 2.5 倍, 但其比酶活下降了一半。引入二硫键的 CALB 突变体 A162C-K308C 在 50 °C 的半衰期 (220 min) 比野生型 (49 min) 提高了约 4.5 倍, 其 V_{\max}/K_m 略微有所下降^[6]。双突变体 D223G/L278M 在 48 °C 下的半衰期为 49 min, 是野生型 (3.8 min) 的 13 倍, 催化效率 k_{cat}/K_m 与野生型相当^[27]。

2.8 pH 稳定性的测定

pH 稳定性测定结果如图 10 所示, 野生型和突变体的 pH 稳定性相似, 在 pH 5.0–11.0 的范围内均有良好的稳定性; 在 pH 3.0 的偏酸性环境中, 突

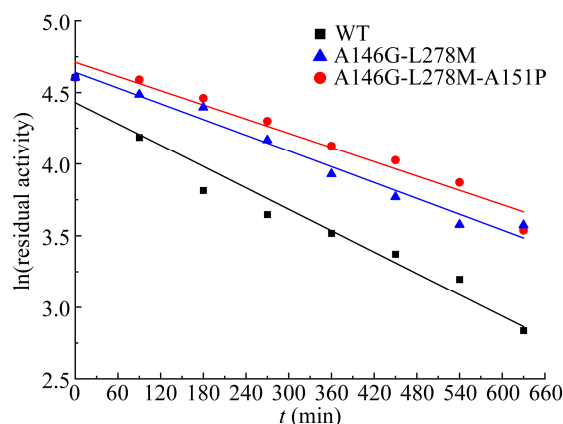


图 9 突变体和野生型在 50 °C 下的热稳定性
Figure 9 Thermal stability of the mutants and the wild-type at 50 °C

变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的残余酶活分别是野生型的 1.6 倍和 2.0 倍, 说明比起野生型, 两株突变体对偏酸性环境具有更好的耐受性。

2.9 酶促反应动力学分析

采用软件 GraphPad Prism 8 对不同底物浓度下 CALB 的初始反应速率进行非线性拟合, 结果如图 11 和图 12 所示。

由图 12 可见, 当固定己酸浓度 1.2 mol/L 时, 随着乙醇浓度的增加, 酶促初始反应速率呈先上升后下降的趋势, 说明乙醇对 CALB 存在竞争性抑

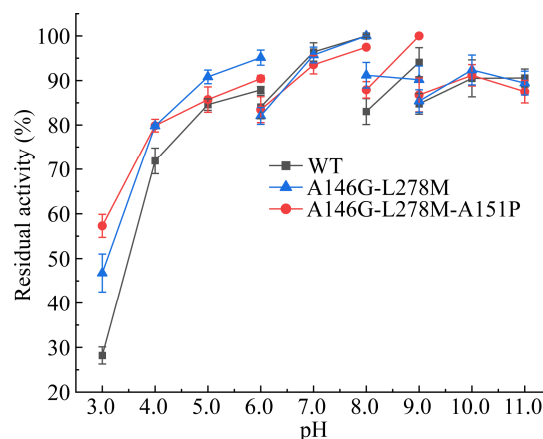


图 10 突变体和野生型的 pH 稳定性
Figure 10 Effects of pH on the stability of the mutants and the wild-type

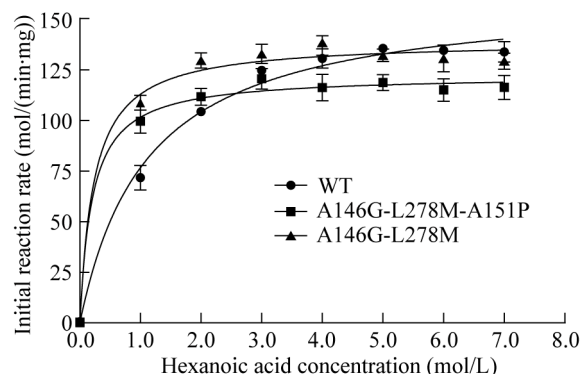


图 11 己酸浓度对初始反应速率的影响
Figure 11 Effect of the hexanoic acid concentration on initial reaction rate

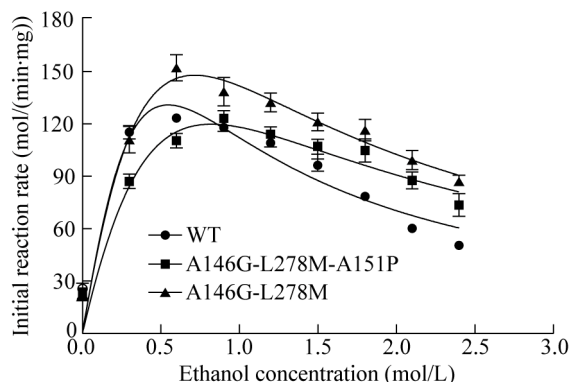


图 12 乙醇浓度对初始反应速率的影响

Figure 12 Effect of the ethanol concentration on initial reaction rate

制作用。多项研究报道了醇对脂肪酶存在竞争性抑制作用^[33-34]。采用软件 GraphPad Prism 8 进行非线性拟合得到 CALB 对己酸和乙醇的酶促反应动力学参数如表 4 所示。

由表 4 可以看出,野生型对己酸的米氏常数 K_{mA} 是上述突变酶的 5 倍左右,表明突变酶对己酸具有更高的亲和力,且突变酶对己酸的催化效率 k_{catA}/K_{mA} 约是野生型的 4 倍。突变酶对乙醇的米氏常数 K_{mB} 比野生型更低,表明相比于野生型, CALB 突变后对乙醇具有更好的亲和力。突变体 A146G-L278M-A151P 对乙醇的催化效率 k_{catB}/K_{mB} 略低于野生型,但突变体 A146G-L278M 对乙醇的催化效率 k_{catB}/K_{mB} 与野生型相当。由于乙醇是 CALB 己酸乙酯合成反应中的竞争性抑制剂,所以乙醇的抑制常数 K_{iB} 反映了乙醇对酯合成反应的抑制强度,抑制常数越小说明抑制能力越强。突变酶的乙醇抑制常数 K_{iB} 是野生型的 3-4 倍左右,说明对于突变酶而言,乙醇对酯合成反应的抑制要小于野生型。目前提高 CALB 热稳定性的文献报道均是以 CALB 的水解酶活为依据^[25-26],而本文是首次以酯合成酶活作为评价指标,在不影响酯合成催化效率的前提下,成功提高了 CALB 的热稳定性。

表 4 野生型和突变体动力学参数的比较

Table 4 Comparison of kinetic parameters of the wild-type and its variants

Parameters	WT	A146G-L278M	A146G-L278M-A151P
K_{mA} (mol/L)	1.118	0.233	0.204
V_{maxA} (μ mol/(min·mg))	162.6	139.3	122.4
k_{catA} (s^{-1})	90.78	77.78	68.34
k_{catA}/K_{mA} (L/(mol·s))	81.20	333.80	335.00
K_{mB} (mol/L)	2.273	1.189	1.302
V_{maxB} (μ mol/(min·mg))	1 218.0	638.9	499.4
k_{catB} (s^{-1})	680.05	356.72	278.83
k_{catB}/K_{mB} (L/(mol·s))	299.19	300.02	214.16
K_{iB} (mol/L)	0.132	0.432	0.520

注: K_{mA} 和 K_{mB} 分别表示 CALB 对底物己酸和乙醇的米氏常数, V_{maxA} 和 V_{maxB} 分别表示 CALB 对底物己酸和乙醇的最大反应速率, k_{catA} 和 k_{catB} 分别表示 CALB 对底物己酸和乙醇的转化数, K_{iB} 为 CALB 对乙醇的竞争性抑制常数。

Note: K_{mA} and K_{mB} are the Michaelis constants of hexanoic acid and ethanol, respectively, V_{maxA} and V_{maxB} are the maximum reaction rates of CALB with hexanoic acid and ethanol, respectively, and k_{catA} and k_{catB} are the turnover number of hexanoic acid and ethanol, respectively, K_{iB} is a competitive inhibition constant for CALB by ethanol.

2.10 分子动力学模拟分析

采用分子动力学模拟计算,可以获得目标蛋白在 100 ns 时间内的运动轨迹和结构变化情况,结果如图 13 所示。如图 13A 所示,两个突变体的 RMSD 变化幅度低于野生型,表明 CALB 氨基酸残基的突变,降低了蛋白分子整体构象 C_{α} 的偏移幅度,说明该突变有利于 CALB 热稳定性的提高。RMSF 是指每个氨基酸残基在整个分子动力学模拟过程中的偏振,残基的位置偏移越大,说明该区域的构象越不稳定。如图 13B 所示,两个突变体和野生型的 RMSF 整体相差不大,说明位点的突变对 CALB 的关键区域结构并没有造成太大的影响。图 13C 显示了回旋半径(R_g)的变化情况,突变体与野生型的回旋半径相差最大不到 0.5 Å,表明 CALB 整体结构的密实度在突变前后变化不大,突变并未对 CALB 的结构造成太大的影响。

通过分子动力学模拟分析,表明 CALB 突变后蛋白骨架中 C_{α} 的偏移幅度有所下降,但整体结构

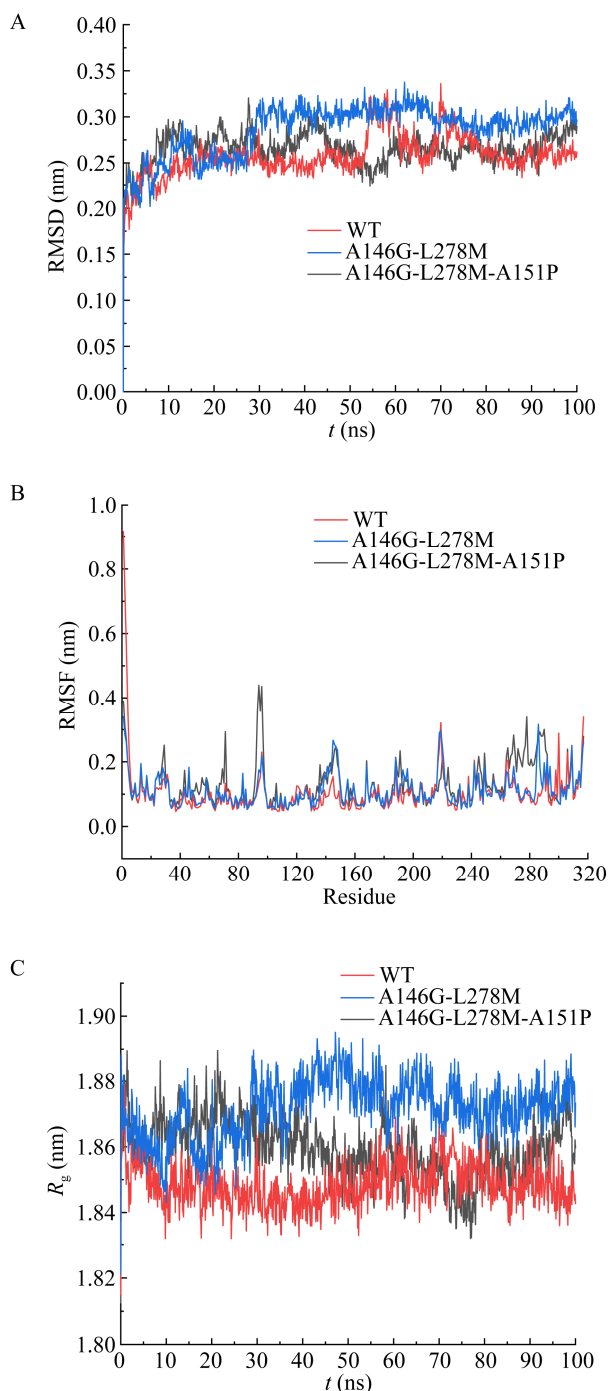


图 13 CALB 在 100 ns 内的运动轨迹和结构变化
Figure 13 Change of CALB motion trajectory and structure within 100 ns

注: A: 均方根偏差(RMSD); B: 均方根涨落(RMSF); C: 回转半径(R_g).

Note: A: Root mean square deviation (RMSD); B: Root mean square fluctuation (RMSF); C: Radius of gyration (R_g).

在突变前后变化不大, 这可能是突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 热稳定性提高的原因。

3 讨论与结论

热稳定性是衡量酶在工业应用中可行性的一个重要参数^[35]。热稳定性高的酶具有良好的动力学稳定性, 可以在严苛的条件下使用^[36]。较高的工作温度有利于加快反应速度, 提高底物溶解度, 并降低微生物污染的风险。此外, 在蛋白质工程中, 具有较高稳定性的酶也具有更大的进化潜力, 因为它们可以接受更广泛的有益突变^[37]。CALB 作为最重要的工业酶制剂之一, 在精细化工、手性药物拆分等方面具有很大的应用潜力, 然而野生型 CALB 较弱的热稳定性使其在实际的生产应用中受到一定限制。研究表明, CALB 在 50 °C 下的半衰期为 49 min, 其 T_m 值为 54 °C^[6]; 其次, CALB 在 60 °C 下孵育 20 min 后, 酶活仅剩 15%^[7]。为了拓宽 CALB 的工业应用, 有许多关于提高 CALB 热稳定性的研究, 主要分为化学材料固定化和蛋白质工程两大类。目前以固定化手段提高 CALB 热稳定性的研究较多^[38-42], 市售的商品固定化酶 CALB 具有较高的耐热性, 但价格也相对昂贵。采用蛋白质工程改造 CALB 以提高其热稳定性的报道较少^[6,14,25-27,43-44]。

本研究根据 CALB 已有的晶体结构(PDB ID: 1TCA), 采用软件 PoPMuSiC 和 FoldX 计算 CALB 潜在的热稳定性突变位点, 最终获得两个热稳定性有所提高的突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P。相比于野生型, 突变体 A146G-L278M 和 A146G-L278M-A151P 的 T_m 值分别提高了 3.3 °C 和 4.2 °C, 最适反应温度提高了 5 °C; pH 稳定性研究表明, 两个突变体在 pH 5.0-11.0 的环境中具有良好的稳定性, 相比于野生型, 其对偏酸性环境具有更好的耐受性; 此外, 酶促反应动力学分析表明, 两个突变体对己酸和乙醇均表现出更高的亲和力, 在己酸乙酯合成反

应中对己酸的催化效率 $k_{\text{catA}}/K_{\text{mA}}$ 是野生型的 4.1 倍。

根据蛋白质三级结构中包含的能量和势能等信息可以预测突变对蛋白质稳定性的影响。据此, 研究人员开发了多种预测蛋白质热稳定性的算法, 例如 PoPMuSiC^[45]、I-Mutant^[46]、FoldX^[47]和 Rosetta^[48]等。但是, 想要实现准确的预测仍是一个很大的挑战, 结合多个预测工具进行计算有利于提高预测的可靠性和准确性^[16]。Le 等^[6]采用计算机工具 MODIP 和 DbD V1.20 预测 CALB 潜在的二硫键形成位点, 最终成功获得热稳定性提高的突变体 A162C-K308C, 相比于野生型, 突变体酶 A162C-K308C 的 T_m 值增加了 1.1 °C, 且在 50 °C 的半衰期增加了约 4.5 倍。Li 等^[49]采用多种计算设计方法对米黑根毛霉脂肪酶进行工程设计, 最终获得了最稳定的突变体 T18K/T22I/E230I/S56C-N63C/V189C-D238C, 在 70 °C 下的半衰期提高了 12.5 倍, 且 T_m^{app} 提高了 14.3 °C; 此外, 突变体脂肪酶的催化效率比野生型高 39%。Broom 等^[50]将 11 种可免费获得的工具组合到一起, 形成一个元预测器 (meieringlab.uwaterloo.ca/stabilitypredict/), 针对约 600 个突变体进行验证, 结果表明该元预测器与任何单个工具相比都具有更高的性能。

已有报道利用定向进化来提高 CALB 的热稳定性。Zhang 等^[14]经两轮易错 PCR 分别得到两株热稳定性提高的突变体 23G5 和 195F, 比起野生型, 突变体 23G5 和 195F1 在 70 °C 的半衰期增加了约 20 倍, 而且其水解催化效率也有所提高。CALB 在毕赤酵母中表达会进行糖基化修饰^[51], N-糖基化修饰对酶的活性、热稳定性和分泌都起到重要作用, 消除天然糖基化位点可能会导致蛋白质不稳定^[52]。虽然在定向进化过程中, 采用真核来源宿主能够对异源蛋白进行翻译后修饰, 但与原核宿主相比, 真核宿主培养时间长、操作繁琐, 大规模筛选耗时耗力。因此本文采用了理性设计的方法, 根据计算机辅助预测极小自由能的突变位

点, 避免了大量的筛选工作。

针对本研究获得的热稳定性提高的突变体, 后续的研究可以结合不同的计算软件和理性设计策略, 进一步对其进行分子改造, 如引入二硫键、柔软区域片段的截短等, 以期进一步提高 CALB 的热稳定性, 继而拓宽 CALB 的工业应用。

REFERENCES

- [1] Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*[J]. Structure, 1994, 2(4): 293-308
- [2] Anderson EM, Larsson KM, Kirk O. One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 1998, 16(3): 181-204
- [3] Enayati M, Gong YJ, Goddard JM, et al. Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents[J]. Food Chemistry, 2018, 266: 508-513
- [4] Sikora A, Siódmiak T, Marszałł MP. Kinetic resolution of profens by enantioselective esterification catalyzed by *Candida antarctica* and *Candida rugosa* lipases[J]. Chirality, 2014, 26(10): 663-669
- [5] Picó EA, López C, Cruz-Izquierdo Á, et al. Easy reuse of magnetic cross-linked enzyme aggregates of lipase B from *Candida antarctica* to obtain biodiesel from *Chlorella vulgaris* lipids[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2018, 126(4): 451-457
- [6] 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
- [7] Kirk O, Christensen MW. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin[J]. Organic Process Research & Development, 2002, 6(4): 446-451
- [8] Velasco-Lozano S, López-Gallego F, Vázquez-Duhalt R, et al. Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking[J]. Biomacromolecules, 2014, 15(5): 1896-1903
- [9] Stepankova V, Bidmanova S, Koudelakova T, et al. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents[J]. ACS Catalysis, 2013, 3(12): 2823-2836
- [10] Bornscheuer UT, Pohl M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5(2): 137-143
- [11] Kaushik M, Sinha P, Jaiswal P, et al. Protein engineering and *de novo* designing of a biocatalyst[J]. Journal of Molecular Recognition, 2016, 29(10): 499-503
- [12] Wijma HJ, Floor RJ, Janssen DB. Structure- and sequence-analysis inspired engineering of proteins for

- enhanced thermostability[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(4): 588-594
- [13] Akbulut N, Tuzlakoglu Öztürk M, Pijning T, et al. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(1): 123-129
- [14] Zhang NY, Suen WC, Windsor W, et al. Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2003, 16(8): 599-605
- [15] Wen S, Tan TW, Zhao HM. Improving the thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2013, 164(2): 248-253
- [16] Wijma HJ, Floor RJ, Jekel PA, et al. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2014, 27(2): 49-58
- [17] Perry LJ, Wetzel R. Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation[J]. *Science*, 1984, 226(4674): 555-557
- [18] Xu Z, Cen YK, Zou SP, et al. Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2020, 40(1): 83-98
- [19] Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84(19): 6663-6667
- [20] Yuen CM, Liu DR. Dissecting protein structure and function using directed evolution[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(12): 995-997
- [21] Si M, Xu Q, Jiang L, et al. SpyTag/SpyCatcher cyclization enhances the thermostability of firefly luciferase[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0162318
- [22] Zhang HT, Sang JC, Zhang Y, et al. Rational design of a *Yarrowia lipolytica* derived lipase for improved thermostability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 137: 1190-1198
- [23] Zhao JF, Wang Z, Gao FL, et al. Enhancing the thermostability of *Rhizopus oryzae* lipase by combined mutation of hot-spots and engineering a disulfide bond[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(72): 41247-41254
- [24] Damnjanović J, Nakano H, Iwasaki Y. Deletion of a dynamic surface loop improves stability and changes kinetic behavior of phosphatidylinositol-synthesizing *Streptomyces* phospholipase D[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(4): 674-682
- [25] Park HJ, Park K, Kim YH, et al. Computational approach for designing thermostable *Candida antarctica* lipase B by molecular dynamics simulation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 192: 66-70
- [26] Kim HS, Le QAT, Kim YH. Development of thermostable lipase B from *Candida antarctica* (CalB) through *in silico* design employing B-factor and RosettaDesign[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 47(1/2): 1-5
- [27] Xie Y, An J, Yang GY, et al. Enhanced enzyme kinetic stability by increasing rigidity within the active site[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(11): 7994-8006
- [28] Dehouck Y, Kwasigroch JM, Gilis D, et al. PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality[J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 151
- [29] Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, et al. The FoldX web server: an online force field[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(S2): W382-W388
- [30] Kumar V, Rahman S, Choudhry H, et al. Computing disease-linked SOD1 mutations: deciphering protein stability and patient-phenotype relations[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 4678
- [31] Trodler P, Nieveler J, Rusnak M, et al. Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1179(2): 161-167
- [32] Gashtasbi F, Ahmadian G, Noghabi KA. New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the *Bacillus subtilis* spore surface by adsorption and covalent immobilization[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2014, 64-65: 17-23
- [33] Duan G, Ching CB, Lim E, et al. Kinetic study of enantioselective esterification of ketoprofen with n-propanol catalysed by an lipase in an organic medium[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(11): 1051-1055
- [34] Gandhi NN, Sawant SB, Joshi JB. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 46(1): 1-12
- [35] Bommarius AS, Blum JK, Abrahamson MJ. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, 15(2): 194-200
- [36] Bommarius AS, Paye MF. Stabilizing biocatalysts[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(15): 6534-6565
- [37] Bloom JD, Labthavikul ST, Otey CR, et al. Protein stability promotes evolvability[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(15): 5869-5874
- [38] Zdarta J, Wysokowski M, Norman M, et al. *Candida antarctica* lipase B immobilized onto chitin conjugated with POSS[®] compounds: useful tool for rapeseed oil conversion[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1581
- [39] Fernandez-Lopez L, Pedrero SG, Lopez-Carrobles N, et al. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 98: 18-25
- [40] Virgen-Ortiz JJ, Pedrero SG, Fernandez-Lopez L, et al. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation.

- Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites[J]. *Molecules*, 2017, 22(1): 91
- [41] Tomke PD, Rathod VK. A novel step towards immobilization of biocatalyst using agro waste and its application for ester synthesis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 366-376
- [42] Urrutia P, Arrieta R, Alvarez L, et al. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: the impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 674-686
- [43] Chodorge M, Fourage L, Ullmann C, et al. Rational strategies for directed evolution of biocatalysts-application to *Candida antarctica* lipase B (CALB)[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2005, 347(7/8): 1022-1026
- [44] Peng XQ. Improved thermostability of lipase B from *Candida antarctica* by directed evolution and display on yeast surface[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(2): 351-358
- [45] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 2093-2096
- [46] Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(S2): W306-W310
- [47] Buß O, Rudat J, Ochsenreither K. FoldX as protein engineering tool: better than random based approaches?[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2018, 16: 25-33
- [48] Jia L, Yarlagadda R, Reed CC. Structure based thermostability prediction models for protein single point mutations with machine learning tools[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138022
- [49] Li GL, Fang XR, Su F, et al. Enhancing the thermostability of *Rhizomucor miehei* lipase with a limited screening library by rational-design point mutations and disulfide bonds[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(2): e02129-17
- [50] Broom A, Jacobi Z, Trainor K, et al. Computational tools help improve protein stability but with a solubility tradeoff[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(35): 14349-14361
- [51] Rotticci-Mulder JC, Gustavsson M, Holmquist M, et al. Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain[J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21(3): 386-392
- [52] Ge F, Zhu LB, Aang A, et al. Recent advances in enhanced enzyme activity, thermostability and secretion by N-glycosylation regulation in yeast[J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 40(5): 847-854