

研究报告

定点突变提高枯草芽孢杆菌角蛋白酶的低温催化活性

周冠宇^{1,2,3}, 李江华^{*1,2}, 彭政^{1,2,3}, 苗周迪^{1,2,3}, 冒鑫哲^{1,2,3}, 张娟^{*1,2}

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 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

3 江南大学未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

周冠宇, 李江华, 彭政, 苗周迪, 冒鑫哲, 张娟. 定点突变提高枯草芽孢杆菌角蛋白酶的低温催化活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 1-13

Zhou Guanyu, Li Jianghua, Peng Zheng, Miao Zhou, Mao Xinzhe, Zhang Juan. Improving the low-temperature activity of *Bacillus subtilis* keratinase by site-directed mutagenesis[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 1-13

摘要:【背景】角蛋白酶 KerZ1 能在 60 °C 的最适温度下高效降解角蛋白底物, 然而其在低于最适温度条件下的酶活极低, 难以适应工业生产和实际应用的要求。【目的】提升角蛋白酶 KerZ1 的低温催化活性。【方法】结合同源比对与折叠自由能分析向角蛋白酶 KerZ1 引入氨基酸突变, 并对突变体的酶学性质进行研究。【结果】对 KerZ1 柔性环区域(loop 13)引入的氨基酸突变 T210S、N211S、T212G 均使其低温催化活性提升。随后对 loop 13 进行了复合突变并构建了三突变体 T210S/N211S/T212G, 该突变体在中等温度(40 °C)和低温(20 °C)条件下的比酶活较 KerZ1 分别提升了 45.68%和 85.74%。同时, 该突变体在 60 °C 的半衰期($t_{1/2}$)仅下降 11.52%, 说明突变体 T210S/N211S/T212G 在不严重损失热稳定性的情况下其低温催化活性得到了显著的提高。【结论】氢键的减少及氨基酸疏水性降低导致的蛋白质分子柔性的提升, 可能是导致突变体酶 T210S/N211S/T212G 低温催化活性提升的主要原因。本研究从实际应用出发对角蛋白酶进行低温催化活性改造, 为其工业化与应用化奠定了基础。

关键词: 角蛋白酶; 低温催化活性; 分子改造; 同源比对; 分子动力学模拟; 分子柔性; 氢键

基金项目: 江苏省重点研发(社会发展)项目(BE2021624)

Supported by: Key Research and Development (Social Development) Program of Jiangsu Province (BE2021624)

*Corresponding authors: E-mail: LI Jianghua: lijiahua@jiangnan.edu.cn; ZHANG Juan: zhangj@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-08-16; Accepted: 2021-09-17; Published online: 2021-10-27

Improving the low-temperature activity of *Bacillus subtilis* keratinase by site-directed mutagenesis

ZHOU Guanyu^{1,2,3}, LI Jianghua^{*1,2}, PENG Zheng^{1,2,3}, MIAO Zhou^{1,2,3}, MAO Xinzhe^{1,2,3}, ZHANG Juan^{*1,2}

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

2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: [Background] The keratinase KerZ1 could efficiently degrade keratin at the optimum temperature of 60 °C. However, the poor activity below the optimum temperature makes the enzyme difficult to be applied in industrial production. [Objective] To improve the low-temperature activity of KerZ1. [Methods] Based on homologous alignment and analysis of folding free energy, site-directed mutagenesis was employed for KerZ1, and then the enzymatic properties of the mutants were characterized. [Results] The introduction of T210S, N211S, or T212G into the flexible loop region (loop 13) increased the low-temperature activity of KerZ1. Subsequently, the compound mutant T210S/N211S/T212G was constructed, which showed the activity 45.68% and 85.74% higher than that of KerZ1 at moderate (40 °C) and low (20 °C) temperatures, respectively. Meanwhile, the half-life ($t_{1/2}$) at 60 °C decreased by only 11.52%, indicating that the low-temperature activity of T210S/N211S/T212G was improved without serious loss of thermostability. [Conclusion] The reduction of hydrogen bonds and surface hydrophobicity may be the main reasons for the increased flexibility of the keratinase molecule, which enhances the low-temperature activity of T210S/N211S/T212G. In summary, this study modifies the keratinase to improve its low-temperature activity and lays a foundation for the practical application of this enzyme.

Keywords: keratinase; low-temperature activity; molecular modification; homologous alignment; molecular dynamics simulation; molecular flexibility; hydrogen bond

角蛋白是一种不溶性且含硫量高的丝状蛋白,广泛分布于动物表皮附属物(如毛发、指甲、爪、龟甲、角、喙和羽毛)中^[1]。由于半胱氨酸和甘氨酸含量很高,角蛋白非常坚韧,其在水中的溶解度低且难以降解^[2]。常用的化学法和物理法处理角蛋白会不可避免地涉及高温、微波和强酸或强碱工艺,这不仅会造成巨大的能量消耗,还会对环境造成负担^[3]。角蛋白酶是一种可以特异性降解角蛋白的水解酶,由土壤、水和各种富含角蛋白的来源中发现的不同类型微生物分泌^[2]。随着可持续性和绿色概念的兴起,角蛋

白酶在工业生产与实际应用中的潜力逐渐被挖掘出来^[4],其在制革^[5]、化妆品^[6]、饲料^[7]等多个行业中都被认为是一种能改善现有工艺的重要生物酶。

我们课题组在前期工作中得到的角蛋白酶 KerZ1 属于角蛋白酶 S8 家族^[2],其在 60 °C 的最适反应温度下可以高效水解角蛋白底物^[8]。然而过高的最适温度可能并不适合如皮革加工、化妆品使用等实际环境。此外,冷适应的酶由于其在中等和更低温度下具有更高的活性,不仅能有效减少工业生产中昂贵的加热成本,限制不必要的

化学副反应对产品造成的不良影响,其热不稳定的特性还可以用于在生产中根据工艺步骤进行选择性的灭活,因而在实际应用中有着巨大的潜力^[9]。因此,对角蛋白酶 KerZ1 的低温催化活性改造能大幅提高其应用价值。

与热适应的同源酶相比,嗜冷酶在低温下通常具有更高的构象灵活性,具体原因包括但不限于甘氨酸和赖氨酸残基数量增加、脯氨酸和精氨酸残基频率降低、疏水核心减少、表面疏水性增加和氢键减少等^[10]。然而灵活的蛋白质结构意味着分子刚性较低,这会导致酶热稳定性的下降,所以对嗜热酶的低温催化活性改造过程中通常需要在低温催化活性与热稳定性之间进行权衡^[11]。由于氨基酸取代和相互作用的复杂性及许多情况下无法正确解释所选随机突变的影响,因此,与成熟的热稳定性改造策略相比,目前对酶的低温催化活性进行改造仍具有挑战性^[12]。一直以来对酶的低温催化活性改造策略以定向进化为主^[13-16]。最近一些新的策略被相继提出,例如:通过不稳定化酶-辅酶-底物三元复合体来降低酶促反应过渡态需要的能量,使酶促反应更易逾越能量壁垒,从而提高酶在低温下的催化效率^[17];通过向酶分子引入额外盐桥从而同时增加末端刚性和催化结构域柔性来提升低温催化活性^[18]等。柔性环区域(loop)是蛋白质结构中最灵活的区域,是调节酶催化活性、稳定性、底物特异性的重要区域,也是提高酶分子低温催化活性的潜在目标。例如对嗜热脂肪酶 A 的 loop 区进行饱和突变来筛选嗜冷酶突变体,这些突变体在低温条件下的分子动力学模拟结果均显示出更高的灵活性^[19]。因此,对酶分子 loop 区柔性改造策略的可行性已得到证实。基于这些假设,我们通过同源比对和计算辅助方法向高温角蛋白酶 KerZ1 柔性环区域引入氨基酸突变,以期提升其中温及低温催化活性,并试图提升其在工

业生产和实际应用场景中的性能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

研究所用质粒 pP43NMK、pP43NMK-KerZ1 及宿主枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) WB600 由本实验室前期构建保存,大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* JM109 Competent Cells 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 和 *Dpn* I, 宝生物工程(大连)有限公司; Bradford 试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; HisTrap[™] HP 预装柱, GE Healthcare 公司; 角蛋白(部分磺化, 5%于水中), 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。PCR 仪, Bio-Rad 公司; 振荡恒温金属浴, Bioer 公司; 酶标仪, BioTek 公司; 紫外分光光度计, Shimadzu 公司。

1.1.3 PCR 引物设计

研究中的引物合成与 DNA 测序通过生工生物工程(上海)股份有限公司完成,使用的引物见表 1。

1.1.4 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0。固体培养基需要额外添加 20.0 g/L 琼脂粉, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

发酵培养基(g/L): 蔗糖 30.0, 蛋白胨 20.0, 酵母粉 10.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6.0, KH_2PO_4 3.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3。 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。

重组大肠杆菌的筛选和培养使用 LB 培养基(含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氨苄青霉素), 培养条件为 37 °C, 摇床转速为 220 r/min, 培养 12 h; 重组枯草芽孢杆菌的筛选和培养使用 LB 培养基(含 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 培养条件为 37 °C, 摇床

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primers name	序列 Sequence (5'→3')
F21Y-F	AAGTGCAGGCTCAAGGCT <u>A</u> TAAAGGGAGCGAATGTAAAAGTAGCCG
F21Y-R	AGCCTTGAGCCTGCACTTTGT
Q36H-F	CTGGATACAGGAATCC <u>A</u> CGCTTCTCATCCGGAAGTTGAACGTAG
Q36H-R	TGGATTCCCTGTATCCAGGACGGC
N61Q-F	GCTTATAACACCGACGGCC <u>A</u> AGGACACGGCACACATGTTGC
N61Q-R	GCCGTCGGTGTTATAAGCTTCG
T161S-F	AGCGGATCTTCAGGAAACT <u>T</u> CGAATACAATTGGCTATCCTGCGAAATACG
T161S-R	GTTTCCTGAAGATCCGCTGTTCCC
N162S-F	GGATCTTCAGGAAACACG <u>A</u> GTACAATTGGCTATCCTGCGAAATACGAT
N162S-R	CGTGTTTCCTGAAGATCCGCTG
I164V-F	TCAGGAAACACGAATACAGT <u>T</u> GGCTATCCTGCGAAATACGATTCTGTC
I164V-R	TGTATTCGTGTTTCCTGAAGATCCGCT
V173T-F	CCTGCGAAATACGATTCT <u>A</u> CCATCGCTGTTGGTGCGGTAGAC
V173T-R	AGAATCGTATTTTCGCAGGATAGCCAAT
F188S-F	AACAGCAACAGAGCTTCA <u>T</u> CTCCAGTGTGGGAGCAGAGCTT
F188S-R	ATGAAGCTCTGTTGCTGTTAGAGTCTAC
G203S-F	ATGGCTCCTGGCGCA <u>A</u> GCCTATACAGCACTTACCCAACGAACACT
G203S-R	TGCGCCAGGAGCCATGAC
T210S-F	GTATACAGCACTTACCCA <u>A</u> GCAACACTTATGCAACATTGAACGGAACG
T210S-R	TGGGTAAGTGCTGTATACGCCTG
N211S-F	TACAGCACTTACCCAACG <u>A</u> GCACTTATGCAACATTGAACGGAACGTC
N211S-R	CGTTGGGTAAGTGCTGTATACGC
T212G-F	AGCACTTACCCAACGAACG <u>G</u> TTATGCAACATTGAACGGAACGTCATGG
T212G-R	GTTTCGTTGGGTAAGTGCTGTATACGC
Y255P-F	TCCAGCACGGCGACTCCTTTGGGAAGCTCCTTCTACTATGGGAAAGG
Y255P-R	AGTCGCCGTGCTGGAG
T210S/N211S/T212G-F	GTATACAGCACTTACCCA <u>A</u> GCAAGCGGTTATGCAACATTGAACGGAACGTCATGG
T210S/N211S/T212G-R	TGGGTAAGTGCTGTATACGCCTGC

注：加下划线的碱基为替换的密码子

Note: The underlined base is the replacement codon.

转速为 220 r/min, 培养 12 h; 重组枯草芽孢杆菌的发酵使用发酵培养基(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 摇床转速为 220 r/min, 培养 24 h。

1.2 角蛋白酶的三维结构模拟

角蛋白酶 KerZ1 氨基酸序列通过氨基酸翻译软件获得, 利用在线服务器 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>)搜索模板, 以与角

蛋白酶 KerZ1 氨基酸序列具有 99.63%相似性的丝氨酸蛋白酶 KerA 与抑制剂 Greglin 复合物(PDB 4gi3, X-RAY DIFFRACTION 1.75 \AA)为模板建立同源模型^[20], 并使用 Molprobit 在线模型分析工具(<http://molprobit.biochem.duke.edu/index.php>)对模型质量进行检测。

1.3 角蛋白酶突变体的构建

对角蛋白酶突变位点进行全质粒 PCR 扩

增^[21], PCR 产物经过 *Dpn* I 酶切消化后转化大肠杆菌感受态细胞, 转化产物涂布 LB 固体培养基。37 °C 培养过夜后从 LB 平板上挑选转化子进行菌落 PCR 验证, 挑选验证正确的阳性转化子提取质粒送样测序, 将测序正确的重组质粒转化表达载体 *B. subtilis* WB600, 转化产物涂布 LB 固体培养基, 37 °C 培养过夜后得到的转化子即为表达目标角蛋白酶突变体的重组菌。

1.4 角蛋白酶突变体的表达及纯化

将重组枯草芽孢杆菌接种至 LB 培养基中, 于 37 °C 培养过夜作为种子液, 取 1 mL 接种于 50 mL 发酵培养基中进行发酵。将获得的菌液于 4 °C、7 000 r/min 离心 20 min, 所得的上清液即为粗酶液。使用 0.22 μ m 水系滤膜对粗酶液进行抽滤后使用 HisTrap™ HP 预装柱纯化角蛋白酶。首先使用缓冲液 A (含 20 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液) 平衡纯化柱, 以 2 mL/min 流速上样 30 mL, 随后使用缓冲液 B (含 500 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液) 取代角蛋白酶, 10% 分离缓冲液 B 等度洗脱置换出目的蛋白。使用 SDS-PAGE 与 Bradford 蛋白定量试剂盒检测酶液的纯度与蛋白浓度。

1.5 角蛋白酶酶活的测定

将酶液进行适当稀释使得反应体系显色后 OD_{660} 在 0.1–1.0 范围内, 以 150 μ L pH 10.0 的 50 mmol/L Gly-NaOH 溶液作为缓冲液, 100 μ L 25 g/L 的可溶性角蛋白作为底物, 加入 50 μ L 稀释的酶液, 混匀后于 60 °C 反应 20 min; 反应结束后立即加入 200 μ L 的 0.5 mol/L 三氯乙酸终止反应, 并于 12 000 r/min 离心 2 min。随后取 200 μ L 反应液加入到 1 mL 50 g/L 的 Na_2CO_3 溶液中, 再加入 200 μ L 福林酚试剂混匀后于 50 °C 显色 10 min, 以加入底物前先加入三氯乙酸终止反应但其他操作相同的反应体系作为空白对照, 使用分光光度计于 OD_{660} 测定吸光度。酶活单位

定义为: 1 个活力单位(U)为吸光度在 OD_{660} 下升高 0.001 单位^[22]。

1.6 角蛋白酶酶学性质的测定

最适反应温度(T_{opt})的测定: 将酶活测定反应温度更改为 20、30、40、50、60、70、80 °C, 其余条件不变, 对纯化后的角蛋白酶 KerZ1 及其突变体进行酶活测定。以各个酶最高酶活作为 100%, 其余温度为相对酶活, 绘制反应温度-相对酶活曲线, 并计算在不同温度条件下各角蛋白酶的比酶活。

半衰期($t_{1/2}$)的测定: 将经过纯化的角蛋白酶 KerZ1 及其突变体酶置于 60 °C 金属浴中保温, 每 10 min 取样并进行酶活测定。以保温处理前酶活作为 100%, 之后每次取样点的酶活为相对酶活。绘制以残余酶活的 \ln 值为纵坐标、保温时间 t 为横坐标的散点图, 对各个数据点进行线性拟合以计算角蛋白酶失活速率常数 k , 带入公式 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ 以计算各个角蛋白酶半衰期^[23]。

反应动力学参数的测定: 将可溶性角蛋白底物稀释成不同质量浓度(0、2、4、6、8、10、12 g/L), 将角蛋白酶酶液进行适当稀释使得反应体系显色后 OD_{660} 在 0.1–1.0 范围内, 测定角蛋白酶 KerZ1 及其突变体在不同底物浓度下的反应初速, 以底物浓度和反应速率绘制散点图, 运用 Origin 2021 对各个数据点使用米氏方程进行非线性拟合直至收敛, 得到最大反应速率(V_{max})和米氏常数(K_m), 并进一步计算催化常数 k_{cat} 及催化效率 k_{cat}/K_m 。

1.7 分子动力学模拟

使用 AMBER16 对角蛋白酶 KerZ1 及其突变体进行分子动力学模拟, 添加力场 ff14SB, 添加水分子盒子包裹蛋白质模型, 设定蛋白质表面到水盒子边界的最小距离为 12 Å, 平衡系统设定为 150 mmol/L 的氯化钠, 分子动力学模拟参数包括能量最小化、50 ps 的 0–300 K 的升

温过程、500 ps 的平衡过程和 20 ns 的动力学模拟^[21]。使用 AMBER16 分析氨基酸残基的均方根浮动(root mean square fluctuation, RMSF)。

2 结果与分析

2.1 角蛋白酶低温催化活性单点突变位点的选择

同源比对常用于酶分子改造中关键突变位点的确定。以角蛋白酶 KerZ1 的氨基酸序列为模板, 从文献中挖掘了 2 株最适反应温度在

40 °C 的角蛋白酶氨基酸序列, 利用 ClustalX 2.1 和 Esprint 3.0 对角蛋白酶 KerZ1 及挖掘的同源序列进行比对和分析^[5,24]。同时使用 PyMOL 软件对建立的角蛋白酶 KerZ1 同源模型(PDB 4gi3) 中的 loop 区进行标注, 结果如图 1 所示。我们向每个 loop 区引入相应的氨基酸单点突变以提升其结构灵活性。然而, 根据同源比对结果有大量的突变位点可供选择, 进一步确定要引入的突变位点需要借助计算机辅助筛选。利用 Discovery Studio 对引入的氨基酸突变进行模拟,

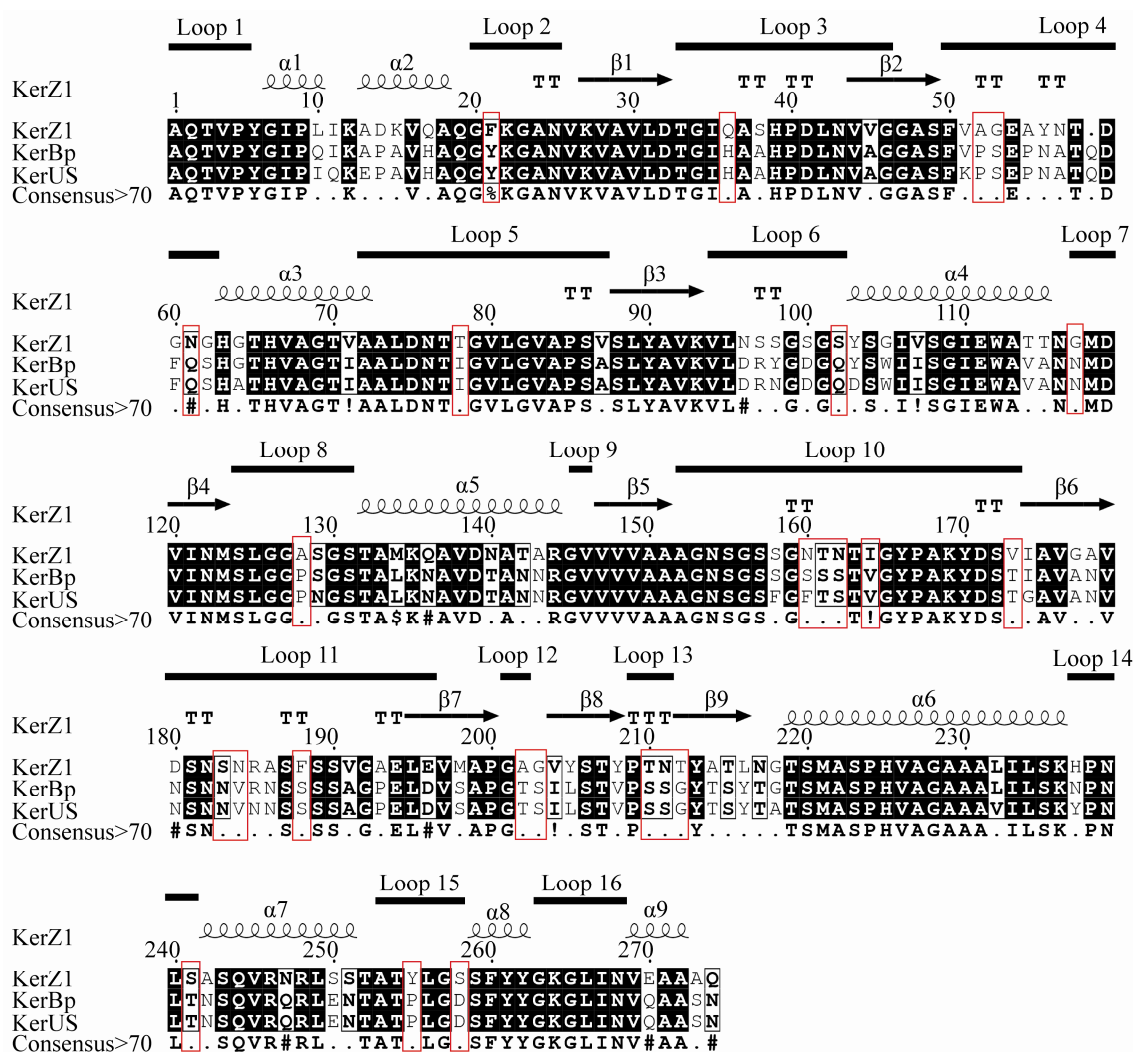


图 1 不同来源角蛋白酶氨基酸序列对比

Figure 1 Comparison of amino acid sequences of keratinase from different sources.

计算突变角蛋白酶的折叠自由能变化($\Delta\Delta G$), 其结果如表 2 所示。折叠自由能(ΔG)是蛋白质从折叠态到伸展态间的吉布斯自由能差, 受氢键、范德华力、熵效应等因素的综合影响, 是最重要的蛋白质热力学参数之一, 也是反映蛋白质结构刚性的重要指标^[25]。一般认为, 蛋白质的 ΔG 越低, 其具有的结构刚性就越强。因此, 在许多研究中都使用了生物信息学方法对蛋白质进行模拟

表 2 各 loop 区引入的模拟氨基酸突变及其 $\Delta\Delta G$
Table 2 The $\Delta\Delta G$ of simulated amino acid mutations in each loops

柔性环区域 Loop	引入的模拟氨基酸突变 Simulated amino acid mutations	折叠自由能变化 $\Delta\Delta G$ (k_{cal}/mol)
Loop 2	F21Y	0.23
Loop 3	Q36H	1.51
Loop 4	A52P	-0.69
	G53S	0.00
	N61Q	0.88
Loop 5	T78I	-0.47
Loop 6	S102Q	-0.27
Loop 7	G117N	-0.55
Loop 8	A128P	-0.49
Loop 10	N160S	-1.03
	N160F	-0.47
	T161S	0.33
	N162S	1.71
	I164V	1.48
	V173T	0.16
Loop 11	S183N	-0.54
	N184V	-0.50
	F188S	2.55
Loop 12	A202T	-0.23
	G203S	0.16
Loop 13	T210S	0.19
	N211S	0.23
	T212G	1.43
Loop 14	S241T	-0.43
Loop 15	Y255P	1.82
	S258D	-0.33

突变, 并通过得到的 $\Delta\Delta G$ 来预测该突变对蛋白质结构刚性的影响, 从而指导蛋白质热稳定性的改造^[26]。本研究的目的在于通过突变得一株在中等和较低温度下仍保留较高酶活的角蛋白酶突变体, 因而更倾向于选择折叠自由能提升(即 $\Delta\Delta G > 0$)的突变位点, 意味着引入的氨基酸突变会使突变体相较原始酶的灵活度更高, 这是提升低温催化活性所必需的。基于上述理论, 我们引入了共计 13 个单点突变对 8 个 loop 区进行柔性改造, 分别为 F21Y、Q36H、N61Q、T161S、N162S、I164V、V173T、F188S、G203S、T210S、N211S、T212G、Y255P。

2.2 角蛋白酶突变体的表达及组合突变

通过全质粒 PCR 扩增将突变氨基酸引入 pP43NMK-KerZ1 为模板, 将测序正确的质粒转化到 *B. subtilis* WB600 中, 摇瓶发酵表达角蛋白酶 KerZ1 及其突变体。在 40 °C 反应条件下测定角蛋白酶粗酶液的酶活, 结果如图 2 所示。在 loop 13 引入的突变体 T210S、N211S、T212G 对角蛋白酶在较低温度下的酶活, 相比野生型角蛋白酶 KerZ1 均有显著的提升, 这说明原始酶可能在该 loop 区的整体结构灵活性不佳, 对该 loop 区的改造易提升其柔性; 与之相反, 在 loop 10 引入的突变体 N161S、N162S、I164V、V173T 均显示出显著且不同程度的活性下降, 则说明原始酶可能在该 loop 区的灵活性较高, 不适宜进行进一步的柔性改造。基于这个假设对 loop 13 进行了复合突变, 构建了角蛋白酶 KerZ1 复合突变体 T210S/N211S/T212G。经过 24 h 的摇瓶发酵, 突变体 T210S/N211S/T212G 粗酶液在 40 °C 的酶活达到了 63.17 ± 3.25 kU/mL, 相较于作为对照的角蛋白酶 KerZ1 的 40.60 ± 0.60 kU/mL 提升了 55.59%, 其在低于最适温度条件下的酶活得到了显著提高。

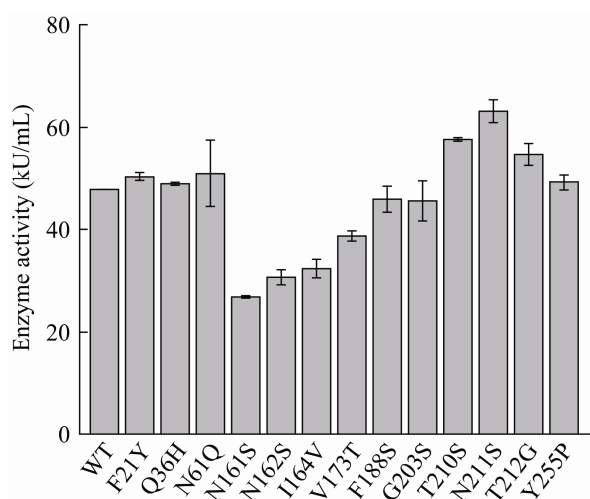


图2 角蛋白酶突变体在 40 °C 反应条件下的酶活
Figure 2 Enzyme activity of keratinase mutants at 40 °C.

2.3 角蛋白酶突变体的纯化及酶学性质

通过镍离子亲和色谱柱对角蛋白酶 KerZ1 和突变体 T210S、N211S、T212G 及其复合突变 T210S/N211S/T212G 的发酵粗酶液进行纯化, 并进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果如图 3 所示, 角蛋白酶 KerZ1 及其突变体的分子量约为 28 kDa。将得到的纯酶液用于进一步的酶学性质分析。

对角蛋白酶 KerZ1 及突变体的酶学性质进行测定, 结果如表 3 所示。突变体的最适反应温度均为 60 °C, 相较于 KerZ1 无变化。在最适温度条件下, 突变体 T210S/N211S/T212G 的比

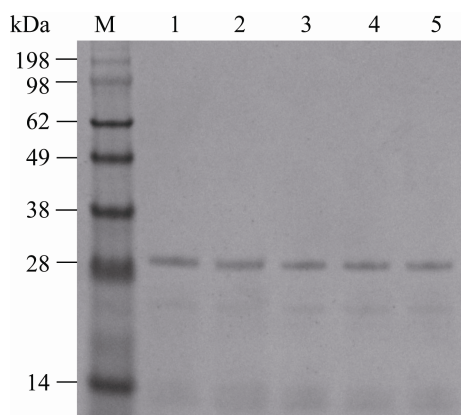


图3 KerZ1 及其突变体的 SDS-PAGE 电泳分析
M: 蛋白质标准分子质量; 1-5: KerZ1、T210S/
N211S/T212G、T210S、N211S、T212G 纯酶液
Figure 3 SDS-PAGE analysis of KerZ1 and mutant
enzymes. M: Protein marker; 1-5: KerZ1, T210S/
N211S/T212G, T210S, N211S, T212G.

酶活与 KerZ1 相比略微下降了 1.66%, 但在 40 °C 的中等温度和 20 °C 的低温条件下其比酶活相比 KerZ1 分别提升了 45.68% 和 85.74%, 单突变体 T210S、N211S、T212G 与 KerZ1 在低于最适温度条件下的比酶活也有不同程度的提高。为进一步探究突变体 T210S/N211S/T212G 在低于最适温度条件下的性能, 绘制了其于 KerZ1 的温度依赖酶活曲线。从图 4 可以看出, 虽然最适温度并未降低, 但该突变体的温度依赖酶活曲线相较于 KerZ1 有明显向低温偏移的趋势。低温催化活性的提升通常意味着分子柔性的提升, 这会影

表3 KerZ1 及其突变体的酶学性质

Table 3 Enzymatic properties of KerZ1 and mutant enzymes

突变体 Mutant enzyme	60 °C 时比酶活 Specific enzyme activity at 60 °C (kU/mg)	40 °C 时比酶活 Specific enzyme activity at 40 °C (kU/mg)	20 °C 时比酶活 Specific enzyme activity at 20 °C (kU/mg)	T_{opt} (°C)	$t_{1/2}$ (min)
KerZ1	186.70±2.08	59.78±0.31	14.10±0.47	60	22.22±1.10
T210S/N211S/T212G	183.60±6.25	87.09±0.64	26.19±1.30	60	19.66±0.75
T210S	205.37±1.71	81.37±4.13	23.14±2.93	60	18.66±0.53
N211S	208.69±2.92	73.97±3.40	17.90±1.67	60	20.56±0.82
T212G	191.00±5.39	78.08±1.69	23.95±1.71	60	15.28±0.79

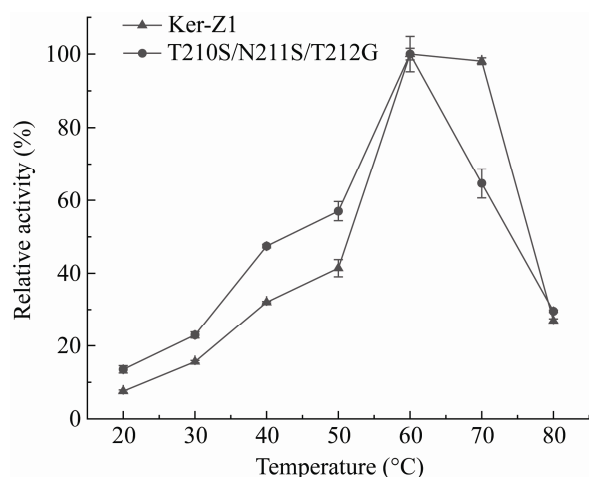


图 4 KerZ1 及突变体 T210S/N211S/T212G 的温度依赖酶活

Figure 4 Temperature-dependent activity of KerZ1 and T210S/N211S/T212G.

响酶的热稳定性, 突变体 T210S/N211S/T212G、T210S、N211S 和 T212G 的半衰期相比 KerZ1 分别降低了 11.52%、16.02%、7.47%和 31.23% (表 3), 由于损失的热稳定性可能会影响突变体 T210S/N211S/T212G 在较低温度下的长期性能, 因此在 40 °C 时温浴角蛋白酶并测定其在该反应温度下的低温催化活性, 以各酶保温处理前的酶活为 100%绘制保温时间与各取样点残余酶活的曲线, 如图 5 所示。经过 12 h 的温浴, 突变体 T210S/N211S/T212G 相比 KerZ1 并未显示出明显的低温催化活性损失, 即该突变体的热稳定性损失对其在较低温度下的长期活性影响较小。综上所述, 突变体 T210S/N211S/T212G 在不严重损失热稳定性的情况下其低温催化活性得到了显著的提高。

在 40 °C 与 60 °C 测定 KerZ1 及其突变体的反应动力学参数, 结果如表 4 所示。冷适应的酶常通过降低底物到产物之间的活化自由能壁垒使其在低温下具有更高的 k_{cat} 值, 与此同时, 它们与底物的结合能力会略低于其嗜热的同源酶

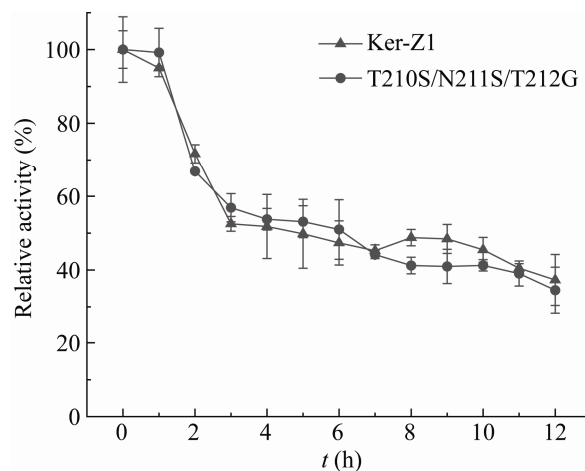


图 5 KerZ1 及突变体 T210S/N211S/T212G 在 40 °C 时的热稳定性

Figure 5 Thermostability of KerZ1 and T210S/N211S/T212G at 40 °C.

表 4 KerZ1 及其突变体的反应动力学参数

Table 4 Kinetic parameters of KerZ1 and mutant enzymes

突变体 Mutant enzyme	K_m (g/L)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (L/(g·s))
60 °C			
KerZ1	1.52±0.14	192.67±2.52	126.91
T210S/N211S/T212G	1.22±0.13	165.77±1.52	135.40
T210S	1.75±0.18	207.66±4.87	118.63
N211S	1.11±0.19	168.02±7.35	151.38
T212G	1.78±0.18	212.97±5.13	119.39
40 °C			
KerZ1	1.53±0.14	50.60±0.62	33.16
T210S/N211S/T212G	1.98±0.09	89.14±1.37	45.06
T210S	1.95±0.13	68.93±0.80	35.29
N211S	2.24±0.19	68.24±1.02	30.50
T212G	1.98±0.10	68.08±0.89	34.26

(具有更高的 K_m 值), 原因是这样可以用更低的能量促成酶分子与底物的复合^[11]。虽然在 60 °C 时突变体 N211S 与 T210S/N211S/T212G 的 k_{cat} 值比 KerZ1 略低, 但由于较低的 K_m 使得其在最适反应温度下相比 KerZ1 仍具有较高的催化效率 (更高的 k_{cat}/K_m)。在 40 °C 条件下, 各突变体的

K_m 及除突变体 N211S 外的 k_{cat}/K_m 与 KerZ1 相比均显示出不同程度的提升, 其中 T210S/N211S/T212G 与 KerZ1 相比 k_{cat}/K_m 提高了 35.89%, K_m 值提高了 29.4%, 符合冷适应的酶在较低温度条件下的反应动力学特征。结果表明, 复合突变体 T210S/N211S/T212G 在低于最适反应温度的条件下虽然与底物的结合能力略低, 但具有更高的催化效率。

3 讨论与结论

利用 PyMOL 对突变角蛋白酶分子结构进行模拟, 并对 loop 3 与 loop 13 及活性位点的位置进行标注, 如图 6 所示。由于该角蛋白酶属于角蛋白酶 S8 家族, 催化活性中心为其典型的催化三联体结构(32D-63H-220S, 球形部分)^[2]。不难发现, 活性位点 32D 所在的 β -折叠(橙色部分)与 loop 3 (黄色部分)直接相连, 而 loop 13 (蓝色部分)及相邻的 β -折叠也与活性位点 220S 所在的 α -螺旋(棕色部分)紧密相连, 因此推测 loop 3 及 loop 13 的结构灵活性会一定程度上影响活性位点 32D 及 220S 所在二级结构的灵活性。同时, loop 3、loop 13 及其相邻的 β -折叠与上述活性位点所在的 α -螺旋及 β -折叠组成的结构将活性位点 63H 所在的 α -螺旋(红色部分)包裹于其中, 推测该结构可能会限制催化三联体所在的 3 个二级结构之间的相对活动, 而影响该结构整体灵活性的关键可能在于连接 loop 3 与 loop 13 的分子间作用力。因此, loop 3 与 loop 13 之间作用力的变化可能会影响该结构的灵活性, 进而影响角蛋白酶的低温催化活性。

图 7 为角蛋白酶 KerZ1 及其复合突变体在引入突变体前后的 210–212 位氨基酸与其他残基间氢键的示意图, 野生酶的 211N 可与 36Q 形成 2 个氢键, 其 212T 则分别与 39H、208Y、213Y 形成 4 个氢键(图 7A); 在引入突变

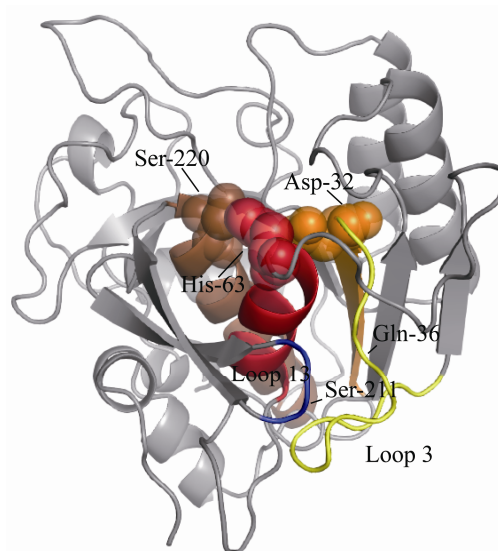


图 6 Loop 3 与 Loop 13 和活性位点在突变体 T210S/N211S/T212G 结构中的位置示意图 球形部分为催化三联体(32D-63H-220S); 红色与棕色部分分别为活性位点 63H 与 220S 及其所在的 α -螺旋; 橙色部分为活性位点 32D 及其所在的 β -折叠; 黄色部分与蓝色部分分别为角蛋白酶的 Loop 3 与 Loop 13

Figure 6 Position of Loop 3, Loop 13 and active sites in the structure of mutant N210S/N211S/T212G. The catalytic triad residues (32D-63H-220S) are shown in spheres; The α -helix where the active site 63H located is shown in red; The α -helix where the active site 220S located is shown in brown; The β -sheet where the active site 32D located is shown in orange; The Loop 3 and Loop 13 of keratinase are shown in yellow and blue respectively.

T210S/N211S/T212G 后, 突变体 211S 与 36Q 形成的氢键减少了 1 个, 而 212G 则不再与 213Y 形成氢键(图 7B), 氢键的减少会降低酶分子解折叠需要的能量, 提升酶分子的柔性。通过分子动力学模拟计算每个氨基酸残基的 RMSF, 以进一步揭示酶分子的灵活性^[18], 结果如图 8 所示。相比 KerZ1, 在突变 T210S/N211S/T212G 引入后, 整个 loop 13 显示出了更高的 RMSF 值, 这说明复合突变的引入使得角蛋白酶在该 loop 区

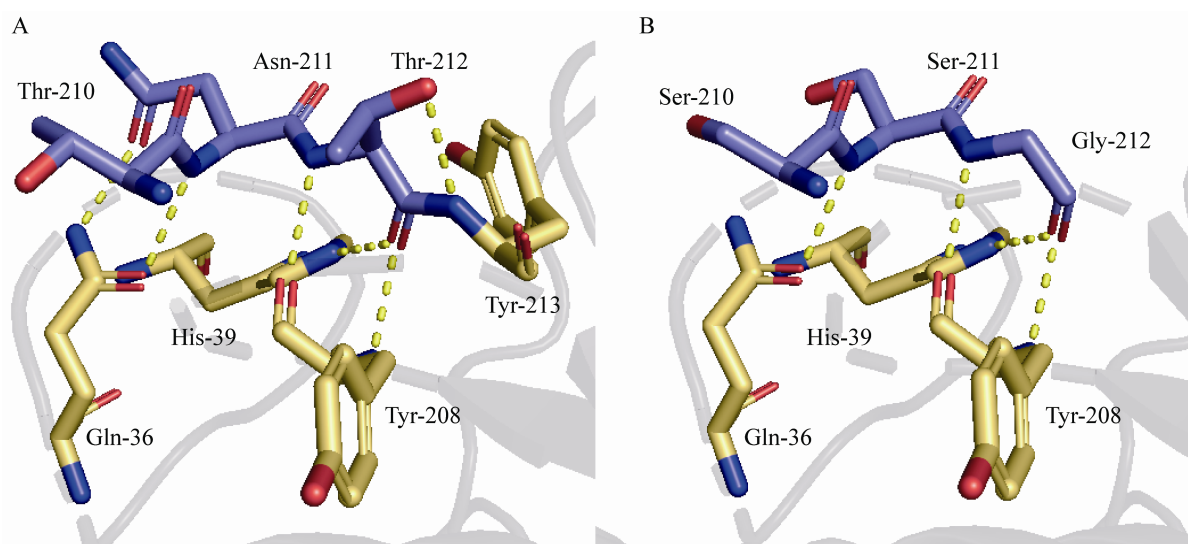


图 7 KerZ1 (A)及 T210S/N211S/T212G (B)的三维结构及其氢键位置示意图

Figure 7 Three-dimensional structure and hydrogen bond position of KerZ1 (A) and T210S/N211S/T212G (B).

的灵活性得到了整体的提升。与此同时,与 36Q 残基氢键的减少也使得 36Q 所在的 loop 3 区域的 RMSF 得到提升,从而可能使得上述 loop 3、loop 13 及其相邻的 β -折叠与角蛋白酶活性位点所在的 α -螺旋及 β -折叠组成的结构灵活性提升。由此推测,loop 3 与 loop 13 间的氢键减少可能是揭示突变体 T210S/N211S/T212G 在低于最适

温度下酶活提高的主要原因。除此之外,211N 具有很强的亲水性,在突变为 211S 后其亲水性有显著的下降,表面疏水性的提升也会使分子柔性得到提升,从而使角蛋白酶的灵活性得到进一步的提高。

为使角蛋白酶 KerZ1 适应工业生产和实际应用环境下的条件,本研究通过同源比对和对虚拟突变进行折叠自由能的分析,向角蛋白酶 KerZ1 中的柔性环区域引入氨基酸突变以提高其灵活性,进而提升角蛋白酶的低温催化活性。结果表明,对柔性环 loop 13 引入的 3 个氨基酸突变均使角蛋白酶 KerZ1 低温催化活性得到提升。对该柔性环进行复合突变并构建的突变体 T210S/N211S/T212G 与角蛋白酶 KerZ1 相比,其在柔性环 loop 3 及 loop 13 的灵活性得到了提高,并在中等温度和低温下均显示出更高的酶活力与催化效率。由于角蛋白酶结构较为复杂^[27],因而本研究中仅对角蛋白酶在溶剂中的结构灵活性进行了初步分析。在下一步的研究中,将解析角蛋白酶在水解角蛋白过程中其底物分子对酶结构造成的影响,从而发掘潜在的角蛋白酶低

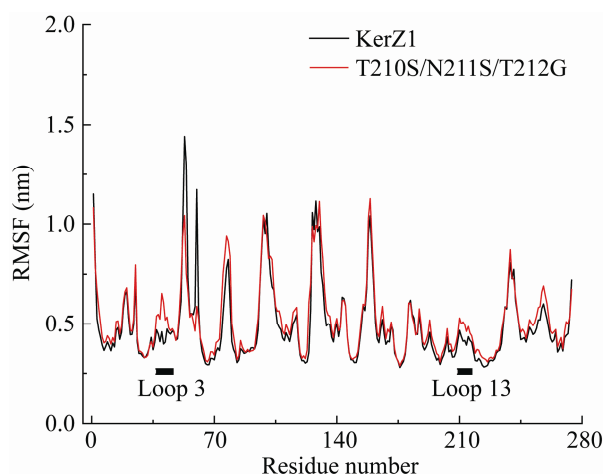


图 8 KerZ1 及 T210S/N211S/T212G 的残基灵活性比较

Figure 8 The residual flexibility of KerZ1 and T210S/N211S/T212G.

温活性突变位点,并为进一步开发角蛋白酶提供理论基础。综上所述,本研究对嗜热角蛋白酶进行低温催化活性改造,有效地提高了枯草芽孢杆菌角蛋白酶在中等和低温条件下的催化活性,为提高其在工业应用中的实用性打下了基础,也为其他工业酶提供了较为新颖的改造思路。

REFERENCES

- [1] Wang B, Yang W, Mckittrick J, Meyers MA. Keratin: structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration[J]. *Progress in Materials Science*, 2016, 76: 229-318
- [2] Qiu JW, Wilkens C, Barrett K, Meyer AS. Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: classification, structure, function[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44: 107607
- [3] De Oliveira Martinez J, Cai GQ, Nachtschatt M, Navone L, Zhang ZY, Robins K, Speight R. Challenges and opportunities in identifying and characterising keratinases for value-added peptide production[J]. *Catalysts*, 2020, 10(2): 184
- [4] Verma A, Singh H, Anwar S, Chattopadhyay A, Tiwari KK, Kaur S, Dhilon GS. Microbial keratinases: industrial enzymes with waste management potential[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(4): 476-491
- [5] Jaouadi NZ, Rekik H, Badis A, Trabelsi S, Belhouli M, Yahiaoui AB, Ben Aicha H, Toumi A, Bejar S, Jaouadi B. Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76722
- [6] Sanghvi G, Patel H, Vaishnav D, Oza T, Dave G, Kunjadia P, Sheth N. A novel alkaline keratinase from *Bacillus subtilis* DP1 with potential utility in cosmetic formulation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 87: 256-262
- [7] 侯玉煌, 丁宏标. 角蛋白酶研究进展及其在饲料工业中的应用[J]. *中国畜牧杂志*, 2018, 54(1): 13-18
Hou YH, Ding HB. Research progress on keratinase and its applications in feed industry[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2018, 54(1): 13-18 (in Chinese)
- [8] Peng Z, Mao XZ, Zhang J, Du GC, Chen J. Biotransformation of keratin waste to amino acids and active peptides based on cell-free catalysis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13(1): 1-12
- [9] Siddiqui KS. Some like it hot, some like it cold: temperature dependent biotechnological applications and improvements in extremophilic enzymes[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(8): 1912-1922
- [10] Nandanwar SK, Borkar SB, Lee JH, Kim HJ. Taking advantage of promiscuity of cold-active enzymes[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(22): 8128
- [11] Siddiqui KS. Defying the activity-stability trade-off in enzymes: taking advantage of entropy to enhance activity and thermostability[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2017, 37(3): 309-322
- [12] Struvay C, Feller G. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(9): 11643-11665
- [13] Sasaki M, Uno M, Akanuma S, Yamagishi A. Random mutagenesis improves the low-temperature activity of the tetrameric 3-isopropylmalate dehydrogenase from the hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*[J]. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2008, 21(12): 721-727
- [14] Hu YC, Li T, Tu Z, He QH, Li YP, Fu JH. Engineering a recombination neutral protease I from *Aspergillus oryzae* to improve enzyme activity at acidic pH[J]. *RSC Advances*, 2020, 10(51): 30692-30699
- [15] Zhao HY, Feng H. Engineering *Bacillus pumilus* alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 34
- [16] Okai M, Onoue C, Tsuda R, Ishigami C, Yoshida-Mishima C, Urano N, Kato C, Ishida M. Q301P mutant of *Vibrio* PR protease affects activities under low-temperature and high-pressure conditions[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2020, 130(4): 341-346
- [17] Sugii T, Akanuma S, Yagi S, Yagyu K, Shimoda Y, Yamagishi A. Characterization of the low-temperature activity of *Sulfolobus tokodaii* glucose-1-dehydrogenase mutants[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 118(4): 367-371
- [18] Zhang R, He LM, Shen JD, Miao Y, Tang XH, Wu Q, Zhou JP, Huang ZX. Improving low-temperature activity and thermostability of exo-inulinase InuAGN25 on the basis of increasing rigidity of the *Terminus* and flexibility of the catalytic domain[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 1233-1244
- [19] Kumar V, Yedavalli P, Gupta V, Rao NM. Engineering lipase A from mesophilic *Bacillus subtilis* for activity at low temperatures[J]. *Protein Engineering, Design and*

- Selection, 2014, 27(3): 73-82
- [20] Derache C, Epinette C, Roussel A, Gabant G, Cadene M, Korkmaz B, Gauthier F, Kellenberger C. Crystal structure of greglin, a novel non-classical Kazal inhibitor, in complex with subtilisin[J]. The FEBS Journal, 2012, 279(24): 4466-4478
- [21] 苗周迪. 枯草芽孢杆菌角蛋白酶热稳定性的改造[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2021
- Miao ZD. Modification the thermostability of *Bacillus subtilis* keratinase[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2021 (in Chinese)
- [22] Lv LX, Sim MH, Li YD, Min J, Feng WH, Guan WJ, Li YQ. Production, characterization and application of a keratinase from *Chryseobacterium* L99 sp. nov.[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(8): 1236-1244
- [23] Ó'Fágáin C. Enzyme stabilization — recent experimental progress[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(2/3): 137-149
- [24] Su C, Gong JS, Sun YX, Qin JF, Zhai S, Li H, Li H, Lu ZM, Xu ZH, Shi JS. Combining pro-peptide engineering and multisite saturation mutagenesis to improve the catalytic potential of keratinase[J]. ACS synthetic biology, 2019, 8(2): 435-433
- [25] 田健, 王平, 伍宁丰, 范云六. 理性设计提高蛋白质热稳定性的研究进展[J]. 生物技术进展, 2012, 2(4): 233-239
- Tian J, Wang P, Wu NF, Fan YL. Recent advances in the rational design to improve the protein thermostability[J]. Current Biotechnology, 2012, 2(4): 233-239 (in Chinese)
- [26] 童理明, 刘松, 李江华, 堵国城, 陈坚. 基于蛋白质折叠自由能分析的定点突变提高谷氨酰胺转氨酶热稳定性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1278-1283
- Tong LM, Liu S, Li JH, Du GC, Chen J. Improvement of TGase thermal stability through site-directed mutagenesis based on analysis of folding free energy[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(12): 1278-1283 (in Chinese)
- [27] 贾如琰, 何玉凤, 王荣民, 李芳蓉, 王艳. 角蛋白的分子构成、提取及应用[J]. 化学通报, 2008, 71(4): 265-271
- Jia RY, He YF, Wang RM, Li FR, Wang Y. Advanced in structure, extract and applications of keratins[J]. Chemistry, 2008, 71(4): 265-271 (in Chinese)