

# 枯草杆菌蛋白酶的基因工程改性

王凡强 马美荣 王正祥 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

**关键词:** 枯草杆菌蛋白酶, 蛋白质工程, 定位诱变

**中图分类号:** Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0218-03

枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)是一种工业上应用很广的酶,在洗涤剂、制革、丝绸等多种行业上有着广泛的用途。特别是用于生产加酶洗涤剂,帮助去除血渍、奶渍、汗渍及可可等各种蛋白污垢。1960年,丹麦人首先利用地衣芽孢杆菌生产了被称为Subtilisin Carlsberg的碱性蛋白酶,随后该酶被用于生产加酶洗涤剂,目前有资料称国外市场上90%是加酶洗涤剂。国内1990年枯草杆菌蛋白酶产量约为1.3万吨,加酶洗衣粉占洗涤剂总量约10%。枯草杆菌蛋白酶的生产菌和研究对象主要是地衣芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、缓慢芽孢杆菌及南极嗜冷芽孢杆菌等<sup>[1]</sup>。枯草杆菌蛋白酶的分子量较小,功能研究得较清楚,产生菌的基因也被克隆,并且有合适的载体系统,这些决定了它是蛋白质工程的理想的研究对象。迄今为止,已经对其进行了400多种不同的定位诱变,对其功能进行改造,使它在洗涤剂中有更好的表现。本文介绍了利用定位诱变技术,从基因水平上改造枯草杆菌蛋白酶的一些成功的结果。

## 1 酶的活性

酶的催化能力的大小是酶的一个关键指标,一般

用 $K_{cat} / K_m$ 来表示酶的催化效率。将枯草杆菌蛋白酶E中的Ile31替换成Val,可使 $K_{cat}$ 提高几倍<sup>[2]</sup>。枯草杆菌蛋白酶BL的Val104用Tyr替换,催化四肽的活性大大提高,对酪蛋白的水解也提高26%;带有 / K27R / V104Y / N123S / T274A / 氨基酸替换的突变酶蛋白水解活性大大提高,在洗涤剂中该突变酶的催化效率是野生酶的2倍。带有 / V104Y / N123S / Y217I / T274A / 氨基酸替换的枯草杆菌蛋白酶BPN'突变酶水解合成底物的活性是野生酶的10倍,在碱性表面活性剂中其活性是野生酶的2倍。将枯草杆菌蛋白酶E的双突变酶I31L / G127A和I31L / G127V引入质粒表达,两个双突变酶由于提高了 $K_{cat}$ ,催化效率提高了3.5倍<sup>[3]</sup>。

## 2 酶的专一性

通过改变枯草杆菌蛋白酶的残基,可以对酶的专一性施加影响。将位于枯草杆菌蛋白酶 $S_1$ 结合口袋的残基Glu156和Gly166借助定位诱变改变Gly166侧链体积和疏水性,或结合对Glu156赋予不同荷电性质时,

收稿日期: 1999-03-29, 修回日期: 1999-05-31

对酶的底物专一性产生很大影响。把 BPN' 酶的与底物残基侧链关系密切的三个残基替换成 Carlsberg 酶的残基,改造后的 BPN' 酶就具有类似于 Carlsberg 酶的专一性。将 His64 残基替换成 Ala,突变酶对 His  $P_2$  底物催化专一性提高 800 倍以上。将 BPN' 酶的五环区的一个或多个用一个或多个氨基酸替换,得到的突变酶适用于去除表面的不溶性底物,从而提高了清洗效果。将枯草杆菌蛋白酶 E 的 Ser161-Tyr162-Ser163-Thr164 缺失,突变酶的活性与野生酶相同,底物特异性类似于碱性弹性蛋白酶的底物特异性<sup>[4]</sup>。

### 3 酶的 pH 活性范围

70 年代以来,洗涤剂配方发生结构性变化,主要为限制磷酸盐用量,增加氧化系漂白剂与过碳酸钠助剂,使洗涤剂碱性增高,pH 值从 9.5~10.5 提高至 10~12,因此要求蛋白酶在高碱性时更加稳定。研究表明丝氨酸蛋白酶的活性对 pH 的依赖性与活性残基 His 的  $pK_a$  值有关。该酶分子表面残基 Asp99 和 Glu156 都距活性残基 His64 达 10 埃以上,分别用 Lys 替换得到的双突变酶在低离子强度下可使其  $pK_a$  值下移一个 pH 单位。对底物结合有贡献的 Tyr104 用 Phe 取代却能使 pH 活性范围向碱性方向扩展<sup>[2]</sup>。

### 4 酶的热稳定性

酶的稳定性是酶正常发挥其生物活性的重要前提,因而人们对酶稳定性的研究具有广泛兴趣,改善酶的稳定性的蛋白质工程的重要目标之一。欧美习惯于加热洗涤,因此要求枯草杆菌蛋白酶有较好的耐热性。通过定位诱变引入盐桥、二硫键、芳香族相互作用和提高酶对钙离子亲和度从而增加分子的刚度,可以提高酶的稳定性。将枯草杆菌蛋白酶 BPN' 的 Gly61 或 Ser98 用 Cys 替换,以及将二者同时替换,结果表明突变酶热稳定性提高,而催化效率并未改变。枯草杆菌蛋白酶 BL 通过蛋白质工程设计获得了 110 株突变株,其中大约 60% 提高了热稳定性,它们的热稳定性在 50℃ 时平均提高了大约 260%,将几个突变结合起来获得的突变酶在 50℃ 时热稳定性提高了 10 倍<sup>[5]</sup>。将枯草杆菌蛋白酶 Savinase 和 Esperase 在 36 位处插入一个 Asp,降低了 Savinase 的等电点,将其稳定性提高了 4℃,并且使酶在液体表面活性剂中稳定性得以提高。在 Esperase 的插入几乎没有影响。Savinase 和 Esperase 的 N76D 突变酶都提高了热稳定性,Savinase 突变酶在液体表面活

性剂中稳定性提高,突变 S128G 将 Savinase 酶的热稳定性提高了 2.8℃,带有 S128G 和 L104V 突变的 Savinase 突变酶热稳定性提高了 10.4℃<sup>[6]</sup>。枯草杆菌蛋白酶 Savinase 突变酶(A194P)和(S188P)热稳定性分别提高了 2.6℃ 和 1.5℃,在液体表面活性剂中的半衰期也延长了<sup>[7]</sup>。将南极嗜冷芽孢杆菌所产的枯草杆菌蛋白酶通过定位诱变(T85D)修饰钙离子配位体,将酶的热稳定性提高至嗜中温枯草杆菌蛋白酶的程度。将枯草杆菌蛋白酶 BPN'、Carlsberg、DY 等的 Gly131 替换为 Asp 和(或)Pro172 替换为 Asp 或 Glu,突变酶由于改变了钙离子结合位点,加强了钙离子和结合位点的静电吸引,从而提高了热稳定性,突变酶在表面活性剂中在变热的情况下失活速度比野生酶慢<sup>[8]</sup>。将枯草杆菌蛋白酶 E 的 218 位的天冬酰胺替换为丝氨酸,有可能与 204 位的丝氨酸之间形成较好的氢键,使 1 个“ $\beta$ -夹夹”的两条反向平行链之间的距离缩短,能提高酶的热稳定性。试验证明突变酶的热稳定性是野生酶的 4 倍<sup>[9]</sup>。

### 5 酶的抗氧化能力

由于枯草杆菌蛋白酶的抗氧化能力较差,当受到氧化剂(增白剂、消毒剂)作用时,会立即失去 90% 的酶活力。因此添加此酶的洗涤剂不能再加增白剂和消毒剂等氧化剂。通过蛋白质工程手段改造枯草杆菌蛋白酶,可使其抗氧化能力提高。将 BPN' 的 Met222 用 Ala, Ser 或 Glu 替换,突变酶产生抗氧化性,在 1M  $H_2O_2$  中保存 1h,仍然保留原有活性。枯草杆菌蛋白酶 E 的突变酶 M222A、M222A / N118S 都具有抗氧化的能力,在 37℃ 与 1M  $H_2O_2$  一起保温 1h,活性仍保留 90%,而 M222A / N118S 突变酶还具有热稳定性<sup>[10]</sup>。

### 6 酶在洗涤剂中的稳定性

将 B. Lentus 所产枯草杆菌蛋白酶的 Val104 变为 Ile 或 Tyr, Asp123 变为 Ser,这一突变酶适用于添加入洗涤羊毛和丝绸织物的洗涤剂中,该洗涤剂含有染料转移的抑制剂<sup>[11]</sup>。枯草杆菌蛋白酶 BPN'、Carlsberg、DY 等通过定位诱变缺失 75~83 位的氨基酸残基,该缺失阻止了钝离子与其高亲和结合位点的结合,但仍然保持酶活性。该突变酶特别适用于含有螯合剂的系统如洗涤剂中<sup>[12,13]</sup>。将枯草杆菌蛋白酶组成疏水表面的氨基酸残基或者其附近的氨基酸残基中的至少一个替换为疏水氨基酸或疏水性更强的氨基酸,修饰后酶的氨基酸序列最好有 80%~90% 的同源性,这样修饰的酶

具有对离子强度的稳定性, 在一个洗衣循环中保持了活性, 当将 BABP92(南极嗜冷芽孢杆菌)所产的枯草杆菌蛋白酶的位于疏水区或疏水区附近的一个氨基酸替换为疏水性更强的氨基酸, 突变酶提高了在洗涤剂中的稳定性和洗涤效果。尤其适用于液体洗涤剂和肥皂中<sup>[14]</sup>。

## 7 酶的低温适用能力

日本和亚洲其它地区习惯于室温洗涤, 因此室温洗涤是近年来对枯草杆菌蛋白酶提出的新课题。利用蛋白质模型和 X-射线晶体学方法已经了解从南极细菌产生的一些嗜冷酶的性质。研究表明嗜冷酶的残基分子内作用弱化, 在一些情况下与溶剂的作用增强, 从而导致更为柔性的分子结构, 在催化时有更少的能量损失。将枯草杆菌蛋白酶的 Val72 替换为 Ile, Ala92 替换为 Thr, Gly131 替换为 Asp, 获得的突变酶在 10℃ 时催化一合成底物的活性比野生酶提高 2 倍。活性的提高是由于酶对底物的特异性提高引起的。该突变酶在 60℃ 热稳定性时接近于野生酶, 在 10℃ 二级结构发生变化<sup>[15]</sup>。

作为蛋白质工程的研究对象, 枯草杆菌蛋白酶的研究已经相当深入和广泛。我们认为, 除了继续对该酶的活性、稳定性、耐碱性、抗氧化能力等进行改造外, 进一步了解酶在洗涤状态时的结构, 通过蛋白质工程的手段使酶在洗涤状态下保持活性和稳定性, 以及通过改造使酶在低温状态下保持活力和稳定性, 以适应亚洲人的洗涤习惯并节约能源, 将是下一步工作的重点。枯草杆菌蛋白酶的研究不仅为该酶的性能改造开辟了途径, 更重要的是它为蛋白质工程的发展作出了

重要的贡献, 为其它酶, 尤其是其它洗涤剂酶(碱性脂肪酶、碱性纤维素酶、碱性  $\alpha$ -淀粉酶等)的性能改造奠定了理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] 薛林贵. 微生物学通报, 1997, 24(6): 370~371.
- [2] 毕汝昌, 储乃明. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(5): 329~334.
- [3] Takagi H, Ohtsu I, Nakamori S. Protein eng. 1997, 10(9): 985~989.
- [4] Takagi H, Matsuzawa H, Ohta T *et al.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 1992, 672: 52~59.
- [5] Goddette D W, Chnstianson T, Ladin B F *et al.* J. Biotechnol. 1993, 28(1): 41~54.
- [6] von der Osten C, Branner S, Hastrup S *et al.* J. Biotechnol. 1993, 28(1): 55~68.
- [7] von der Osten, Hedegaard L, Ostergaard B, *et al.* Stud. Org. Chem. 1993, 47: 133~144.
- [8] Enzon-Labs. US Patent, 1993, 5260~207.
- [9] 王贤舜, 王培之, 孔丽云等. 生物化学与生物物理学报, 1993, 25(1): 51~56.
- [10] 朱榴琴, 季永梅. 生物工程学报, 1997, 13(1): 13~17.
- [11] Baeck A C, Busch A, Verschuere A K M. European Patents, 1995, 687733.
- [12] Bryan P N, Alexander P A, Strauberg S L. US Patents, 1995, 470333.
- [13] Bryan P N, Alexander P A, Strauberg S L. US Patents, 1998, 5707848.
- [14] Klugkist J, Markvardsen P, von der Osten C *et al.* PCT Patents, 1996, 9634935.
- [15] Taguchi S, Ozaki A, Momose H. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64(2): 492~495.