

专论与综述

饲用植酸酶蛋白质工程研究进展*

陈 惠¹ 王红宁² 吴 琦² 赵海霞²(四川农业大学生命科学与理学院 雅安 625014)¹(四川农业大学动物科技学院 雅安 625014)²

摘要: 植酸酶作为一种单胃动物的饲料添加剂, 它的推广和应用受到酶性质的局限。本文在植酸酶改良性策略, 以及提高饲用植酸酶的表达量, 改善热稳定性, 提高催化效率, 改良最适 pH 等方面介绍了植酸酶蛋白质工程方面的研究进展。

关键词: 植酸酶, 蛋白质工程

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0106-05

Research and Progress on Feed Phytase Reform by Protein Engineering

CHEN Hui¹ · WANG Hong-Ning² WU Qi² ZHAO Hai-Xia²(College of life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)¹(College of Animal Sci. & Tech., Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)²

Abstract: As a kind of additive in feed of monogastric animals, the application of natural phytase is limited due to its disadvantages. In this paper, the strategies of phytase reform was introduced. Furthermore, the research and progress on protein engineering of feed phytase was reviewed, including phytase over-expression, phytase thermostability, catalytic efficiency and optimum pH.

Key words: Phytase, Protein engineering

植酸酶可将植物性饲料中植酸及其盐分解为肌醇和磷酸, 增加可利用磷的含量, 降低植酸对矿物质和蛋白质的亲和力, 解除植酸的抗营养作用, 从而增加动物对蛋白质和某些金属离子的吸收能力。作为一种单胃动物的饲料添加剂, 它的饲喂效果已在世界范围内得到了确证。但是, 目前植酸酶在饲料中的推广和应用还相当有限, 主要原因在于: (1) 植酸酶在天然材料中的含量太低, 难以大量生产; (2) 植酸酶的热不稳定性不能完全满足饲料加工、贮藏、使用的要求。因此, 人们想到用迅速发展的蛋白质工程方法来设计和改造天然植酸酶。目前, 用蛋白质工程手段在提高饲用植酸酶的表达量, 改善热稳定性和改良植酸酶催化性质等方面已取得较大进展。

1 植酸酶改性的策略

要获得具有新的功能和特性酶的方法有两种: 一种是从大量自然存在的微生物中

* 国家科技部“十五”国家科技攻关计划资助项目 (No. 2002BA514A-12);

四川省科技厅应用基础研究资助项目 (No. 03JY029-029)

收稿日期: 2003-06-10, 修回日期: 2003-10-10

筛选能够产生期望性质的酶,通过基因工程技术,在适合宿主中表达。另一种则运用蛋白质工程对已存在酶的 DNA 或氨基酸序列进行修饰改造。对于在自然进化中没有选择的性质来说,后一种途径更适合^[1]。蛋白质工程是把分子生物学、结构生物学、计算生物学结合起来,形成的一门高度集中的科学^[2]。利用合理设计(rational design),同序概念(consensus concept),杂合酶(hybrid enzyme)策略来设计和改造天然酶,已成为植酸酶改性的有效方法。

1.1 合理设计(rational design) 通常需要有酶的结构信息,以及序列与结构功能之间关系的知识。在已阐明来源于真菌和细菌植酸酶的氨基酸序列、三维结构和活性中心的基础上,利用分子模型,同源植酸酶序列的比较已成功地用定点突变技术改变了植酸酶基因,从而改变氨基酸序列,产生具有应用价值的饲用植酸酶。

1.2 同序概念(consensus concept) 对一组同源蛋白质的氨基酸序列进行比较,以一定的标准程序计算出各氨基酸序列的共有序列,人工合成同序基因后重组表达。Lehmann 等(2000)把这种方法应用在真菌植酸酶家族设计合成了同序植酸酶基因,并表达出具热稳定性的同序植酸酶。该方法有下列优点:(1)同序基因中的每一个给定的氨基酸残基与同源野生蛋白质中相应位点的氨基酸残基至少有一个是适宜进化的,从而减少有害突变的冒险;(2)此方法不需要了解蛋白质的三维结构;(3)不需要针对高通量筛选的分析方法^[3]。

1.3 杂合酶(hybrid enzyme) 把来自不同酶分子的结构单元(二级结构,三级结构,功能域)或整个酶分子进行组合或交换以产生具有所需性质的优化酶杂合体结构,组合出新酶,并可产生催化自然界不存在的反应的新酶分子,作为开发序列组合进化信息的有效手段^[4]。

2 饲用植酸酶改性研究进展

2.1 定点突变提高植酸酶的表达量 植酸酶的生产菌株表达量低,难以获得大量产品,使生产成本太高,利用高效表达系统作为生物反应器,大规模低成本地大量生产植酸酶,无疑是解决这一问题行之有效的方法之一。利用毕赤酵母表达植酸酶可以获得大量产品,表达量由原始菌株的每毫升几微克提高到 1~10 毫克,并能在酵母中进行糖基化修饰等蛋白质翻译后加工,提高酶的生物活性。为了提高植酸酶在酵母中的表达率,可通过定点突变将部分在毕赤酵母中低偏爱性的密码子替换为高偏爱性的密码子。姚斌等对在毕赤酵母中表达的植酸酶基因 *phyA2* 进行了 Arg 密码子的优化突变,将 4 个 Arg 密码子(有 3 个编码 Arg 密码子是 CGG,1 个是 CGA)突变成高频使用的 ACA,Arg 密码子优化后其表达量可达每毫升培养液 15,000 U,比 Arg 秘密子没有优化的表达量提高了近 37 倍^[5]。彭日荷等按照毕赤酵母的偏爱密码,合成 1.3 kb 烟熏曲霉耐高温植酸酶基因 *fphy*,经过高密度发酵后,重组酵母植酸酶的表达量达到 5.6 g/L,比原始基因表达量提高 13 倍^[6]。贝锦龙等将黑曲霉 NRRL3135 菌株的植酸酶基因中部分在毕赤酵母中低偏爱性的密码子替换为高偏爱性的密码子,主要替换编码 S、R、T、G、P、L 等氨基酸的密码子,也有少量编码 A、C、V 等氨基酸的密码子被替换,最后得到 *phyA-as* 序列,全人工合成的改良黑曲霉 NRRL3135 植酸酶基因 *phyA-as* 在毕赤酵母菌株 x-33 中的高效表达。在摇床培养条件下,每毫升发酵液产生 165,000 U 植酸酶的水平^[7]。

2.2 改善植酸酶的热稳定性 目前所知的植酸酶熔点在 56℃~63℃之间,加工饲料都需经过一个制粒工艺,在制粒过程中有一个短暂的高温过程,温度一般在 75℃~93℃,而一般植酸酶的活性在此高温下将大幅度的不可逆地丧失。所以能在饲料中真正得到推广利用的植酸酶应该具有良好热稳定性,但另一方面,饲料用酶又必须在常温下具有较高的酶活性,因为饲料用酶最终的作用场所是动物正常体温(37℃左右)的肠道中,这与工业上所使用的一些高温酶不同。采用同序概念(consensus concept),定点突变,杂合酶方法,获得热稳定性改善的饲用酶,往往引起:(1)邻近氨基酸残基间氢键、盐键和二硫键的形成;(2)增加疏水相互作用及离子间相互作用,或 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的稳定性等^[8]。

2.2.1 同序概念在植酸酶热稳定性方面的应用: Lehmann 等(2000)把同序概念这种方法应用在真菌植酸酶家族含 13 种不同子囊菌类的序列,进行同序比较计算,设计合成了同序植酸酶基因 *fcp*,构建表达载体 pFP,在 *H. polymorpha* 中表达出同序植酸酶-1。同序植酸酶-1 的最适温度为 71℃,而亲代植酸酶的最适温度为 45℃~55℃,增加了 16℃~26℃,同序植酸酶-1 T_m 为 78℃,比亲代植酸酶增加了 15℃~22℃,而催化性质与大多数亲本植酸酶相似^[8]。

经定点突变发现在同序植酸酶-1 中有 5 个氨基酸 Y31, P225, M342, F346, Y372, 表现增加同序植酸酶的热稳定性,两种残基 F296, A384 不稳定。晶体结构表明 M342, F346 氨基酸残基增加疏水侧链的大小,导致更紧密的疏水核, Y31 和 Y372 由于形成额外的氢键而增加稳定性, P225 稳定同序植酸酶的环。在同序植酸酶-1 中 A384 在疏水中心产生孔穴。若用 L 替代 A,将很好填充同序植酸酶的孔穴,热稳定性增加 1℃。同序植酸酶中的 F296 用非同序氨基酸 Y296 替换,将导致与 D335, Q54 两个额外氢键的形成。这些位点间形成稳定的氢键,使酶的三级结构更加牢固,同序植酸酶中 F296 不仅不能形成氢键,而且还干扰周围氨基酸氢键网, Y296, I384 每一个位点的突变都会使植酸酶对温度的耐受性降低 1℃~2℃^[8]。

Lehmann 等(2002)在上述研究的基础上,通过增加更多的真菌植酸酶序列到组合中去。这些组合用于计算出两种同序植酸酶氨基酸序列,即同序植酸酶-10 和同序植酸酶-11。同序植酸酶-10 比同序植酸酶-1 T_m 和最适温度分别表现 7.4℃和 9.0℃增加。通过定点突变检测,8 个位点氨基酸残基的替换(E35A, D174N, E244D, R268I, R306H, S341T, A356K, G381A),和 11 个位点氨基酸残基的替换(E35A, D46K, D174N, T191L, E199T, E244D, R268I, R306H, S341T, A356K, G381A)可增加植酸酶的热稳定性,将这些突变分别增加到同序植酸酶-1 中,产生同序植酸酶-1-thermo (8) 和同序植酸酶-1-thermo (11)。同序植酸酶-1-thermo (8) Q27T 和同序植酸酶-1-thermo (11) Q27T 比同序植酸酶-1 T_m 增加 6.7℃和 10.5℃^[3]。

2.2.2 杂合酶在植酸酶热稳定性方面的应用: 用杂合酶的方法可将同源植酸酶的相同部位的二级结构单元进行交换,产生杂合植酸酶,提高植酸酶的热稳定性。Lutz 等(2001)根据 *A. niger* 植酸酶晶体结构,在 *A. terreus* 植酸酶的表面 α -螺旋(66~82 区域)被相应 *A. niger* 植酸酶置换,导致杂合酶蛋白 A 热稳定性改善,与 *A. niger* 相似,而酶活性未变。其原因在于两个不同来源的植酸酶在分子表面 α -螺旋中氨基酸改变 S58Y, T70L, A78V 导致疏水相互作用,增加热稳定性。同源蛋白稳定性的不同是由于许多在进化中分散在整个序列中单点突变引起的。通过用更稳定或较不稳定相互作用的同源

片段改变具很小稳定性或更多不稳定的相互作用的元素能引起稳定性的改善^[4]。

2.2.3 定点突变提高植酸酶的热稳定性:通过定点突变的方法将植酸酶非活性中心的个别氨基酸替换,增加了疏水相互作用,提高酶的热稳定性。Eric 等将大肠杆菌 (*Escherichia coli* pH2.5) 植酸酶基因 *appA* 3 个位点进行突变,即 C200N/D207N/S211N,突变最适温度为 65℃,未突变的植酸酶最适温度为 55℃。在 80 和 90℃ 处理 15 min, C200N/D207N/S211N 突变的剩余酶活比未突变的高。突变植酸酶热稳定性的改进可能增加了疏水相互作用^[9]。

2.3 提高植酸酶催化效率 改善植酸酶的催化效率可提高植酸酶应用的经济效益。酶的催化效率除了受各种环境因素的影响外,主要由酶的活性中心包括结合部位,催化部位的个别氨基酸残基决定。通过对活性中心个别氨基酸残基定点突变,提高植酸酶的催化效率。Lehmann 等(2000)以同序植酸酶-1 为骨架,结合 *A. niger* NRRL3135 植酸酶活性位点残基,产生同序植酸酶-7,即将同序植酸酶-1 大部分的活性位点氨基酸残基用相应的 *A. niger* NRRL3135 中氨基酸残基替代,形成同序植酸酶-7。活性位点的改变改善了同序植酸酶的催化性质,提高了同序植酸酶-1 比活力,在 pH5.0,同序植酸酶-1 比活力为 44.1 ± 4.1 U/mg,同序植酸酶-7 为 63.7 ± 7.2 U/mg, *A. niger* NRRL3135 植酸酶为 102.5 ± 19.9 U/mg^[10]。Edward 等将 *A. niger* NRRL3135 植酸酶底物结合位点 300 位氨基酸残基 K 突变为 E,导致在 37℃, pH4.0 和 pH3.0 条件下,植酸水解率分别增加 56% 和 19%^[11]。另外,除了对活性中心氨基酸残基的改变而外,也可对非活性中心某些氨基酸残基替换,通过增加酶分子构象柔性来改善植酸酶的催化效率。Eric 等将大肠杆菌 (*Escherichia coli* pH2.5) 植酸酶基因 *appA* 3 个位点进行突变,即 C200N/D207N/S211N,实验结果得知突变植酸酶并没有糖链的增加,但它比未突变植酸酶比活力高 54%,催化效率提高 1.9 和 5.3 倍。突变位点没有在底物结合部位,而 C200 和 C210, C178 和 C188 之间的二硫键存在于酶的 α 结构域中 G 螺旋与 GH 环之间,由于突变 C200N 使在 α 结构域中的二硫键消失,增强了植酸酶分子的构象柔性,从而增加酶的催化效率^[9]。再者,在所有酶催化反应中产物释放的快慢直接影响酶促反应的催化效率,可以通过改变由离子相互作用引起强烈的底物和产物结合,影响产物释放的氨基酸,加快催化期间产物的释放,提高植酸酶的催化效率。Andrea 等(2000)在黑曲霉 T213 中将 R297 突变为 Q (R 在 T213 中, Q 在 NRRL3135 中),引起催化性质不同。分子模型显示, R297 可能直接作用于植酸磷,产生低比活力的原因可能引起强烈的底物和产物结合降低在催化期间产物的释放^[12]。同时, Andrea Tomschy 等还发现 *A. fumigatus* 植酸酶的 Gln27 与底物结合和释放有关,可能与酶的比活力低有关,在 pH5.0 时, *A. fumigatus* 植酸酶的比活力为 26.5 U/mg,而 *A. terreus* 植酸酶为 196 U/mg。 *A. terreus* 植酸酶在相同的部位为 Leu。将 *A. fumigatus* 植酸酶 Gln27 突变为 Leu,比活力增加为 92.1 U/mg。 *A. fumigatus* 植酸酶的 Gln27 与六磷酸肌醇的 6-磷酸基形成氢键,而氨基酸突变将削弱和失去此氢键^[13]。

2.4 改良饲用植酸酶的最适 pH 要使植酸酶能在畜禽体内产生有效的催化作用,就必须使酶与畜禽的生理条件(体温及消化道的 pH 值)相适应。不同的动物消化道的 pH 值不同,即使是一种动物在消化道的不同部位 pH 值也不同,一般的 pH 值胃为 1.5 ~ 3.5,小肠为 5 ~ 7、大肠为 7 左右。因此要求饲用酶对 pH 值有较大的适应范围。pH 主要影响酶活性部位上关键残基的侧链基团或底物的解离,使酶与底物不能结合,或结

合后不能进一步反应生成产物。因此,可通过对氨基酸残基的置换,改变活性中心的氢键网,或改变氨基酸残基的电子环境。从而改变催化基团的 pK_a 值。Tomschy 等(2002)通过定点突变改变真菌和同序植酸酶的 pH 活性范围,用 Lys、His 替换野生的 *A. fumigatus* 植酸酶 Gly277、Tyr282,将产生第2个最适 pH 在 2.8~3.4。另外,在同序植酸酶和 *A. fumigatus* 中 K68A 单点突变,以及在 *A. fumigatus* 植酸酶进行 S140Y, D141G 双突变,以植酸为底物将降低最适 pH 值 0.5~1.0 单位,而酶的比活力没有明显变化^[14]。

综上所述,蛋白质工程方法已成功用于改善饲用植酸酶的热稳定性,催化活性,最适 pH 范围,甚至是蛋白质表达率,特别是同序概念方法已展示了在改善酶热稳定性方面的应用前景。近年来,改善酶性质的一种新的策略是 DNA 重组技术,即 DNA shuffling 技术,它是基因在分子水平上进行有性重组,通过改变单个基因(或基因家族)原有的核苷酸序列,创造新基因,并赋予表达产物以新功能,这实际上是一种分子水平上的定向进化。通过 DNA Shuffling 技术可获得比普通突变方法更多的序列空间性质,具有在改善酶催化性质系统工程上更有效,可能通过一个步骤获得2个或更多的酶的最适性质^[1,10];另外一种策略是结构延伸突变,即在酶蛋白的C末端上连接一段随机肽段,从而改变酶蛋白的结构,改善酶性质^[15]。这些方法都为改善植酸酶的性质提供了一个十分重要的新思路。

参考文献

- [1] Zhang J H, Dawes G, Stemmer W P C. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94**: 4504~4509.
- [2] 朱国萍. 安徽师大学报(自然科学版), 1998, **21** (4): 402~405.
- [3] Lehmann M, Loch C, Middendorf A, et al. Protein Engineering, 2002, **15** (5): 403~411.
- [4] Jermutus L, Tessier M, Pasamontes L, et al. J Biotechnol, 2001, **85** (1): 15~24.
- [5] 姚 斌, 张春义, 王建华, 等. 中国科学(C辑), 1998, **28** (3): 238~243.
- [6] 彭日荷, 熊爱生, 李 贤, 等. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34** (6): 725~730.
- [7] 贝锦龙, 陈 庄, 杨 林, 等. 生物工程学报, 2001, **17** (3): 254~258.
- [8] Lehmann M, Kostrewa D, Wyss M, et al. Protein Eng, 2000, **13** (1): 49~57.
- [9] Rodriguez E, Wood Z A, Karplus P A, et al. Arch Biochem Biophys, 2000, **382** (1): 105~12.
- [10] Lehmann M, Lopez-Ulibarri R, Loch C, et al. Protein Science, 2000, **9**: 1866~1872.
- [11] Mullaney E J, Daly C B, Kim T. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, **297**: 1016~1020.
- [12] Tomschy A, Wyss M, Kostewa D. FEBS Letters, 2000, **472**: 169~172.
- [13] Tomschy A, Tessier M, Wyss M, et al. Protein Science, 2000, **9**: 1304~1311.
- [14] Tomschy A, Brugger R, Lehmann M. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **4**: 1907~1913.
- [15] 李弘剑, 张 毅, 周天鸿, 等. 遗传, 2000, **22** (2): 96~100.