

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (6) :748 - 754; 4 June 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140529

## 热稳定性伯克霍尔德菌脂肪酶 A 突变体的筛选

刘艳如<sup>\*</sup>, 邱黎清, 黄建忠, 赵丙春, 王作镇, 朱晓兰, 高媛媛, 舒正玉<sup>\*</sup>

福建师范大学, 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 教育部工业微生物工程中心, 生命科学学院, 福建 福州 350108

**摘要:**【目的】为更好地提高伯克霍尔德菌 ZYB002 脂肪酶 LipA 在 TMP 纸浆造纸工艺中的应用, 有必要利用蛋白质工程技术, 提高其热稳定性。【方法】基于 B-factor 值筛选 LipA 多肽链中潜在的突变位点, 利用迭代饱和诱变技术, 构建突变文库, 筛选热稳定性提高的突变体。【结果】利用上述方法, 从 4 个突变文库中分别筛选到在 55℃ 下, 半衰期较野生型脂肪酶 LipA 分别提高了 1.8 倍、3 倍、2.2 倍和 1.7 倍的脂肪酶突变体。【结论】基于 B-factor 值选择突变位点, 利用迭代饱和突变技术, 快速筛选到热稳定性有显著提高的突变体。

**关键词:**热稳定性, B 值, 饱和诱变, 伯克霍尔德菌脂肪酶 A

**中图分类号:**Q814      **文章编号:**0001-6209(2015)06-0748-07

微生物脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) 作为一种重要的工业生物催化剂, 已广泛应用于工业、农业、制药等诸多领域。在一些应用领域, 如造纸, 对微生物脂肪酶的热稳定性具有较高的要求。尽管极端微生物脂肪酶资源及其应用已有较多报道, 但受其催化活性及其催化特异性的局限, 目前鲜有极端脂肪酶被大规模地应用于生产<sup>[1]</sup>。利用蛋白质工程技术, 对现有脂肪酶资源进行改造, 提高脂肪酶的稳定性, 依然是当前的主流技术之一。

利用定向进化技术, 筛选热稳定性酶分子已有较多成功的报道<sup>[2-3]</sup>, 但该技术涉及到对庞大突变基因文库的高通量筛选, 目前依然存在巨大的挑战。近年来, 以蛋白质分子晶体结构的 B 值 (B-factor) 高低作为筛选准则, 快速确定影响脂肪酶热稳定性的潜在氨基酸残基; 继而利用蛋白质工程技术改造脂肪酶分子, 筛选热稳定性脂肪酶突变体, 获得了较好的效果。Reetz 等 (2006) 利用 B-FIT 这一策略对枯

草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 脂肪酶 LipA 进行改造, 仅从 8000 个转化子中, 即筛选到在 55℃ 下半衰期较野生型脂肪酶提高了 490 倍的突变体<sup>[4]</sup>。该方法的有效性, 在构建其他脂肪酶热稳定性突变体中, 也得到了很好的验证<sup>[5-6]</sup>。

本课题组自主筛选到的伯克霍尔德菌 (*Burkholderia* sp. ZYB002) 脂肪酶 LipA 在机械浆造纸工艺中, 能有效控制树脂障碍的产生<sup>[7]</sup>。进一步提高脂肪酶 LipA 的热稳定性, 是提高脂肪酶使用效果, 将其更好地应用于造纸工艺中的先决条件 (机械浆温度高达 80℃)。本文报道以 B-factor 值作为筛选准则, 构建热稳定性 LipA 突变体的初筛结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与载体: *Burkholderia* sp. ZYB002 菌株

**基金项目:**国家自然科学基金项目 (31370802); 福建省科技厅重点项目 (2013H0021); 福建省自然科学基金杰青项目 (2009J06013)

<sup>\*</sup> 通信作者。Tel/Fax: +86-591-22868212; E-mail: shuzhengyu@fjnu.edu.cn

**作者简介:**刘艳如 (1964 -), 女, 福州人, 副教授, 主要从事微生物天然产物的研究。E-mail: yrliu@fjnu.edu.cn

**收稿日期:**2014-11-07; **修回日期:**2015-01-20

由本实验室从油污土壤中分离<sup>[8]</sup>; 该菌株胞外脂肪酶 LipA 编码基因由本实验室克隆, 并提交 NCBI 核酸数据库 (登录号为: EU768869)。表达载体 pACYC-*lipA-lipB* 及重组菌株 *E. coli* BL21 (DE3) - pACYC-*lipA-lipB* 由本实验室构建并保存。

**1.1.2 工具酶、引物及试剂:** PrimeSTAR HS DNA Polymerase, *Dpn* I 限制性内切酶及标准分子量的

DNA Marker 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司; 脂肪酶底物 4-硝基苯月桂酸酯 (*p*-Nitrophenyl laurate) 购自 Sigma (美国) 公司; 氯霉素购自鼎国生物技术有限公司; 其他试剂均为市售分析纯。本实验使用的引物如表 1 所示。

表 1. 本实验使用的简并性 PCR 引物  
Table 1. Sequence of the NNK primers used for PCR

Primer code	Mutant amino acid residue	Sequence (5'→3')	Annealing temperature / °C
BF1F	Glu <sup>35</sup>	CGGCATCCAGNNK GACCTGCAACAGAACGGTGCGACC	64
BF1R		CTGTTGCAGGTCMNNCTGGATGCCGTACCAATACTCG	
BF2F	Phe <sup>221</sup>	CCGACGCTCTCCGTGNNKGGCGTCAACGGGTGCGG	57
BF2R		CGCACCCGTGACGCCMNNACGGAGAGCGTCGG	
BF3F	Val <sup>220</sup>	CGACGCTCTCCNNKTTCCGGCGTCAACGGGTGCGACGG	57
BF3R		GTGACGCCGAAMNNGGAGAGCGTCGGCTGGATCGCC	
BF4F	Leu <sup>218</sup>	TCCAGCCGACGNNKTCCTGTTCGGCGTCAACGGGTG	57
BF4R		CCGAACACGGAMNNCCTCGGCTGGATCGCCGTGCC	

## 1.2 *Burkholderia* sp. ZYB002 脂肪酶 3D 结构模型的构建及其突变位点的选择

选取 PDB 数据库中的洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶 3LIP 作为模板, 构建并评估 *Burkholderia* sp. ZYB002 脂肪酶 LipA 的 3D 结构模型。分子模型具体构建方法如下: 比对脂肪酶 3LIP 和 LipA 多肽链的氨基酸序列, 确定存在的氨基酸差异性位点。在 YASARA 软件中, 实现 3LIP 蛋白结构的可视化; 利用该软件的 SWAP 功能, 将 3LIP 与 LipA 多肽链差异性位点的氨基酸残基, 逐一替换为 LipA 对应的氨基酸残基, 获得 LipA 3D 结构的初始模型。在 AMBER03 力场下对初始模型进行优化并评估模型质量<sup>[9]</sup>。

利用 B-FITTER 软件分析 3LIP 晶体中, 具有较高 B-factor 值的氨基酸残基及其在多肽链中的位置<sup>[10]</sup>。比对 LipA 与 3LIP 多肽链氨基酸残基序列, 在 LipA 多肽链中, 选择与 3LIP 多肽链中具有较高 B-factor 值的氨基酸残基所在位置及类型相同的氨基酸残基作为潜在突变位点。

## 1.3 文库的构建

以质粒 pACYC-*lipA-lipB* 为模板, 利用表 1 中的引物对, PCR 扩增全长质粒。PCR 扩增程序为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 57°C 退火 30 s (构建 Glu<sup>35</sup> 突变体文库时, 退火温度为 64°C), 72°C 延伸 6 min, 25 个循环; 72°C 补平 6 min。PCR 扩增产物经电泳鉴定

后, 加入 1 μL *Dpn* I (25 μL PCR 扩增产物) 37°C 酶切 2 h 后, 再次加入 1 μL *Dpn* I 37°C 酶切 2 h, 胶回收目的片段。回收目的片段转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。随机挑取 400 个转化子到新的 LB 抗性平板 (含 50 μg/mL 氯霉素), 作为突变文库, 37°C 倒置培养 24 h 后, 抗性平板保存于 4°C, 以便后期筛选。

## 1.4 突变文库多样性和质量的评价

从文库 A (Glu<sup>35</sup>) 中随机挑取 40 个转化子送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测序结果与野生型脂肪酶 LipA 的基因序列进行比对, 从而分析突变文库的质量和多样性。

## 1.5 *lipA* 的诱导表达

将转化子挑到装有 800 μL LB 培养基 (含 50 μg/mL 的氯霉素) 的 2 mL EP 管中, 以 1 mmol/L IPTG 诱导 *E. coli* BL21 (DE3) - pACYC-*lipA-lipB* 的表达。30°C, 220 r/min 诱导培养 16 h 后, 6021 × g 离心 5 min, 收集 *E. coli* 菌体。用 pH 7.4 20 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲溶液洗涤菌体一次, 并重新用 800 μL 相同的缓冲溶液悬浮菌体。悬浮菌体依次在 -20°C 和 37°C 中反复冻融 5 - 6 次后, 4°C 13548 × g 离心 10 min, 收集上清液, 作为粗酶液, 进行后续分析实验。

## 1.6 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定采用比色法<sup>[11]</sup>。酶学反应体

系组成如下:20 mmol/L pH7.4 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液 2870  $\mu\text{L}$ ,粗酶液 30  $\mu\text{L}$ ,10 mmol/L 4-硝基苯月桂酸酯 100  $\mu\text{L}$ 。在上述反应体系及 40 $^\circ\text{C}$  条件下,摩尔消光系数(410 nm)为 0.015 L/(cm $\cdot\mu\text{mol}$ )。在上述条件下,每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$ 对硝基苯酚所需要的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

### 1.7 热稳定性提高的脂肪酶突变体的筛选

取 100  $\mu\text{L}$ 粗酶液转移到另外一个 1.5 mL EP 管中,55 $^\circ\text{C}$  下热处理粗酶液 12 min 后,迅速冰浴冷却终止热变性。室温下静置 30 min,测定粗酶液经热处理后的残余酶活,并与野生型 Lip A 在相同条件下残留的酶活进行比较,筛选出残余酶活大于野生型脂肪酶的突变体,进行复筛。

### 1.8 脂肪酶 $T_{50}^{12}$ 的测定

$T_{50}^{12}$  值是指脂肪酶在特定温度下处理 12 min 后残余酶活为 50% 时对应的温度。具体测量方法如下:以 40 $^\circ\text{C}$  时脂肪酶的残余酶活作为 100%,分别测定脂肪酶在不同温度下(45–70 $^\circ\text{C}$ ) 处理 12 min 后的残余酶活。绘制温度对残余酶活图,计算  $T_{50}^{12}$  值<sup>[12]</sup>。

### 1.9 脂肪酶 $t_{1/2}$ 的测定

$t_{1/2}$  值是指脂肪酶在特定温度下处理一段时间后残余酶活为 50% 时对应的时间。具体测量方法如下:以最适温度下脂肪酶的酶活作为 100%,分别测定并计算出脂肪酶在 55 $^\circ\text{C}$  下处理不同时间后的

残余酶活。以处理时间为横坐标,以  $\ln(\% \text{残余酶活})$  为纵坐标,绘制时间– $\ln(\% \text{残余酶活})$  图,据图计算  $t_{1/2}$  值<sup>[2,13]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 突变位点的选择

*Burkholderia* sp. ZYB002 脂肪酶 LipA 的 3D 分子结构模型如图 1-A,  $\beta$ -折叠位于 LipA 3D 分子结构的中央,  $\alpha$ -螺旋围绕在  $\beta$ -折叠的周围,分子结构特点符合  $\alpha/\beta$ -水解酶的 3D 结构特点。Ser<sup>87</sup>、Asp<sup>264</sup> 和 His<sup>286</sup> 构成了活性中心的催化三联体,催化三联体之间能形成稳定的氢键(图 1-B)。

PDB 数据库中,已收录有多个 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶 LipA 的晶体数据。通过 3D 结构评估,选择 3LIP 作为筛选高 B-factor 值氨基酸残基的晶体模型。比对本实验使用的 LipA 分子与 3LIP 分子多肽链的氨基酸残基差异性发现,在 3LIP 分子多肽链中,具有较高 B-factor 值的前 20 个氨基酸残基,与本实验使用的 LipA 脂肪酶分子的多肽链,仅 2 个氨基酸残基之间存在差异(Ile<sup>218</sup>/Leu<sup>218</sup> 和 Thr<sup>137</sup>/Ser<sup>137</sup>);不相同的这 2 个氨基酸残基,从极性分类来看,其实是相同(或一致)的。本文选取的 4 个突变体在 LipA 分子 3D 结构模型中的位置如图 1-C。

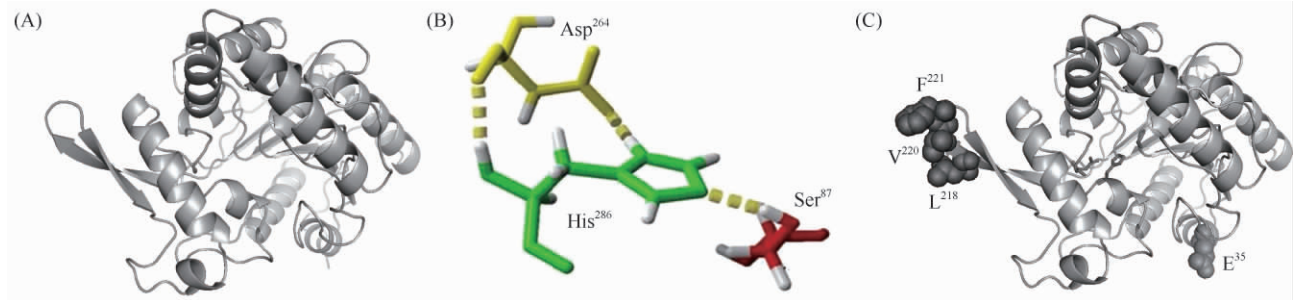


图 1. LipA 3D 结构模拟图及突变位点在 3D 分子结构中的位置

Figure 1. The 3D structure model of the LipA and the sites chosen for saturation mutagenesis. A: 3D structure model of LipA; B: The hydrogen bond between the catalytic triad of LipA; C: 3D structure model of LipA display the sites chosen for saturation mutagenesis.

### 2.2 突变文库质量评价

随机从 Glu<sup>35</sup> 突变文库中挑选 40 个转化子对 *lipA* 基因进行序列分析,并与野生型基因序列进行比对。除了 3 个转化子的测序结果失败之外,其余 37 个转化子在相应位置(Glu<sup>35</sup>) 均实现了突变。32 个转化子在相应位置突变的氨基酸类型及数量如图 2-A,另外 5 个转化子为异常的插入突变。32 个转

化子的氨基酸型突变覆盖范围为 70%。

### 2.3 不同突变文库中正突变类型及效应

从每个文库中,随机挑取 400 个转化子进行诱导表达、裂解、粗酶液经热处理后进行残余酶活的测定,并与野生型脂肪酶进行比较。凡是残留酶活大于野生型脂肪酶的转化子均进行基因序列分析,突变体的突变氨基酸残基的种类如表 2。从图 3 和表

2 可以看出, 筛选出的阳性突变体残余酶活均高于野生型的 5% - 40%。

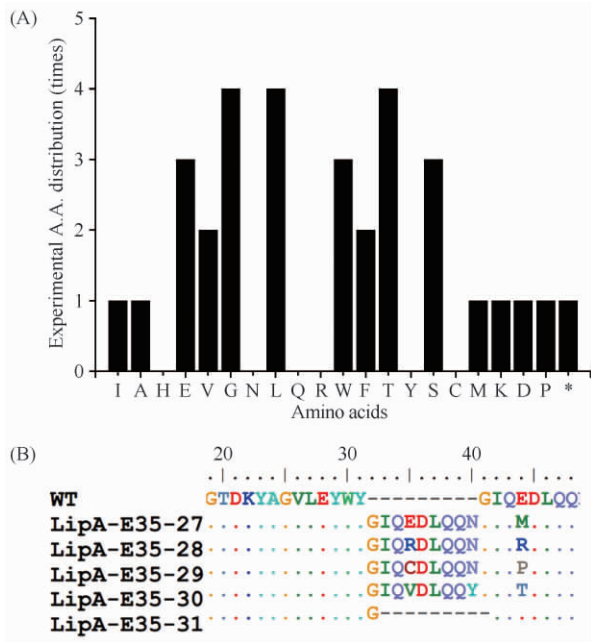


图 2. 脂肪酶 LipA E<sup>35</sup> 位点饱和突变文库中氨基酸种类、分布及插入突变类型

Figure 2. Experimental amino acid distributions and insertion mutation of the saturated mutation library for lipase LipA E<sup>35</sup> site. A: The type and distribution of amino acids from mutation library E<sup>35</sup>. Stop codons of *E. coli* are represented by the sign of asterisk; B: The sequences alignment among various mutants which contain multiple primer insertions.

表 2. 不同突变文库中筛选出的突变体

Table 2. Variants screening from different mutant libraries

Library	Mutational type	Increase rate of residual activity / %	Library	Mutational type	Increase rate of residual activity / %
E <sup>35</sup>	G	12.27 ± 1.78	V <sup>220</sup>	S	12.18 ± 1.92
E <sup>35</sup>	P	37.08 ± 0.49	V <sup>220</sup>	P	16.50 ± 2.86
F <sup>221</sup>	S	17.20 ± 1.56	V <sup>220</sup>	W	24.77 ± 2.55
F <sup>221</sup>	H	17.49 ± 1.26	V <sup>220</sup>	D	24.45 ± 0.76
F <sup>221</sup>	G	20.40 ± 0.54	V <sup>220</sup>	E	36.36 ± 0.25
F <sup>221</sup>	P	24.10 ± 0.73	L <sup>218</sup>	F	5.05 ± 0.14
F <sup>221</sup>	N	26.98 ± 0.2	L <sup>218</sup>	I	7.93 ± 0.67
F <sup>221</sup>	E	36.52 ± 1.18	L <sup>218</sup>	N	11.18 ± 0.59
F <sup>221</sup>	D	42.72 ± 1.74	L <sup>218</sup>	T	15.71 ± 1.58
V <sup>220</sup>	T	11.06 ± 0.88	L <sup>218</sup>	D	19.16 ± 1.71
V <sup>220</sup>	Q	11.51 ± 2.60	L <sup>218</sup>	E	38.20 ± 2.51
V <sup>220</sup>	A	14.24 ± 0.34			

## 2.6 脂肪酶突变体稳定性提高的分子机制分析

利用 YASARA 软件对野生型脂肪酶 LipA 和 4 个阳性突变体的 3D 结构进行分析, 建模如图 6 所示。比较突变前后, 氨基酸残基的溶剂可接近面积

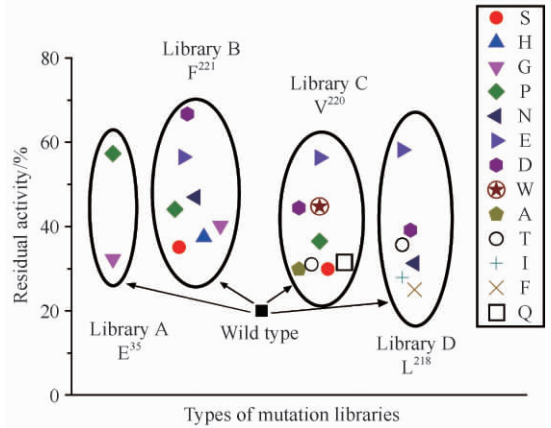


图 3. 定点突变后突变子的残余酶活

Figure 3. Residual activity of mutants by site directed mutagenesis.

## 2.4 野生型脂肪酶及其突变体 $T_{50}^{12}$ 的测定

野生型脂肪酶与阳性突变体的  $T_{50}^{12}$  测定结果如图 4。野生型 LipA  $T_{50}^{12}$  为 51℃, 突变体 LipA-E<sup>35</sup>P 的  $T_{50}^{12}$  为 54℃, LipA-F<sup>221</sup>D 为 57℃, LipA-V<sup>220</sup>E 为 54.6℃, LipA-L<sup>218</sup>E 为 55.4℃。

## 2.5 野生型脂肪酶及其突变体 $t_{1/2}$ 的测定

野生型脂肪酶与脂肪酶阳性突变体的  $t_{1/2}$  测定结果如图 5。野生型 LipA 的  $t_{1/2}$  为 5.20 min, 突变体 LipA-E<sup>35</sup>P 的  $t_{1/2}$  为 9.60 min, LipA-F<sup>221</sup>D 为 15.70 min, LipA-V<sup>220</sup>E 为 11.48 min, LipA-L<sup>218</sup>E 为 8.75 min。

发现, 突变体在突变部位的氨基酸残基的溶剂可接近面积均有显著的增大(表 3)。对于 LipA-V<sup>220</sup>E 突变体而言, 在 E<sup>220</sup>-G<sup>222</sup>-V<sup>223</sup> 之间形成了 3 个氢键, 而野生型脂肪酶 LipA 在此部位仅形成 2 个氢键。

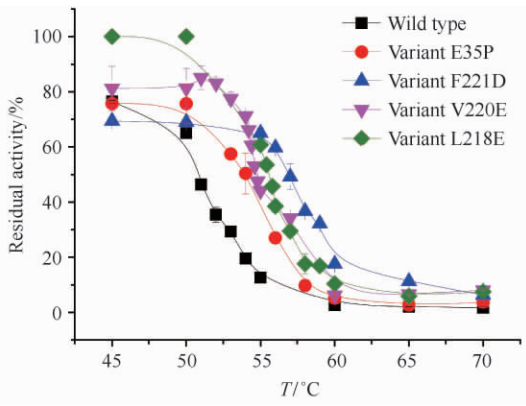


图 4. 野生型脂肪酶及其突变体  $T_{50}^{12}$  的测定

Figure 4. The  $T_{50}^{12}$  of wild type lipase and mutants.

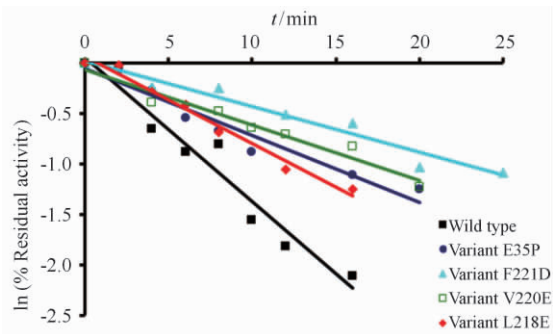


图 5. 野生型脂肪酶及其突变体  $t_{1/2}$  的测定

Figure 5. The  $t_{1/2}$  value of wild type lipase and mutants.

### 3 讨论

对于尚未有晶体数据的酶分子,如何筛选潜在

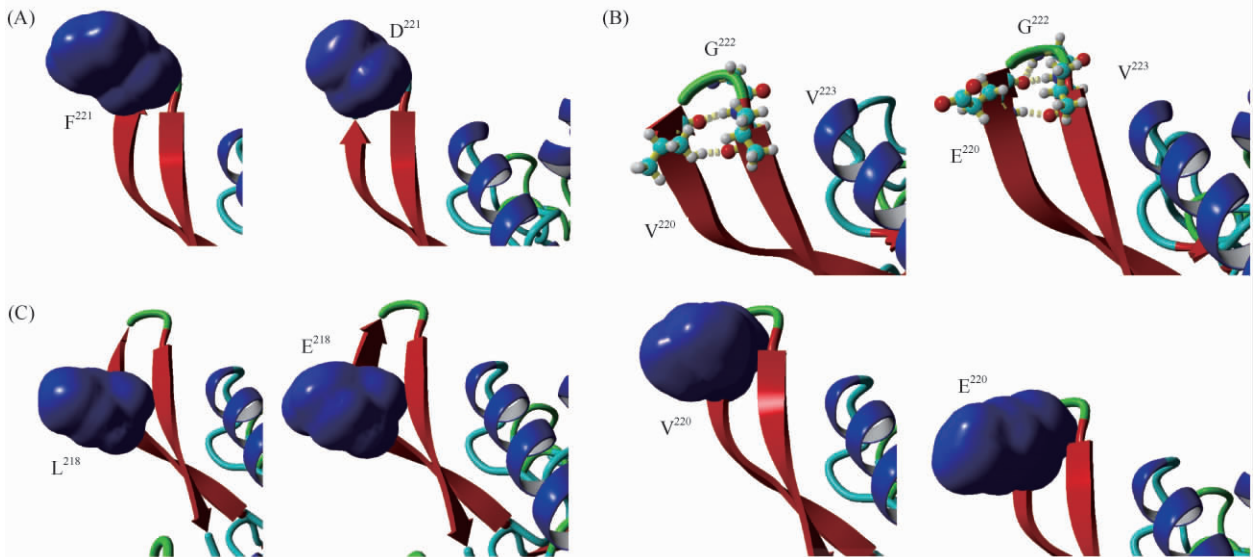


图 6. 野生型脂肪酶及其脂肪酶突变体突变部位氨基酸残基的溶剂可接近表面积模型图

Figure 6. The 3D structure model for solvent accessible surface area of a specific amino acid residue between the wild type lipase and lipase mutants. A: LipA-F<sup>221</sup>D; B: LipA-V<sup>220</sup>E; C: LipA-L<sup>218</sup>E.

突变位点,存在诸多不确定性。本文基于氨基酸序列比对和结构比对的基础筛选潜在突变位点,获得了较好的效果。从构建的突变文库中,均筛选到热稳定性有明显提高的脂肪酶 LipA 突变体。解析晶体结构时,由于各个脂肪酶分子结晶条件的差异性,导致不同晶体中,高 B-factor 值氨基酸残基所存在的位置及种类存在显著的差异(如 5LIP 和 3LIP 之间)。我们分别对 9 个 *B. cepacia* LipA 的晶体数据进行逐一评估<sup>[14]</sup>,同时,结合分析 B-factor 值时对晶体特点的要求<sup>[10]</sup>,最终选择 3LIP 晶体数据作为本实验分析 LipA 突变位点的模板。

利用 NNK 简并性引物构建饱和突变文库<sup>[15-17]</sup>,虽然简单易行但易产生大量冗余密码子,导致文库中氨基酸的不均等分布,同时还存在表达宿主菌对密码子的偏好性等问题<sup>[16-17]</sup>。在对 E<sup>35</sup>文库评价实验过程中,我们也观察到相同的现象,不同氨基酸密码子的分布呈现严重的不均匀性(图 2-A)。在我们挑取的 40 个转化子测序中,尽管氨基酸类型突变覆盖率只有 70%(14 种氨基酸残基/20 种氨基酸残基),但考虑到我们对每个基因组文库挑取了 400 个转化子进行初筛,而且在其他文库中也筛选到其他类型的氨基酸残基(如 His、Asn 和 Gln,见表 2),因此可以推测,我们筛选的转化子至少覆盖了 90% 以上的氨基酸类型。与此同时,在对突变体测序中发现,相当一部分脂肪酶突变体,为插



入型突变(图 2-B)。进一步优化 PCR 扩增条件、优化引物,对提高文库质量,是必要的。

表 3. 野生型 LipA 和脂肪酶突变体突变部位氨基酸残基的溶剂可接近表面积

Table 3. The solvent accessible surface area of the specific amino acid residue

Type of amino acid residue	F <sup>221</sup>	D <sup>221</sup>	V <sup>220</sup>	E <sup>220</sup>	L <sup>218</sup>	E <sup>218</sup>
Solvent accessible surface area (Å <sup>2</sup> )	196.66	233.39	96.41	264.02	127.67	259.24

Val<sup>220</sup> 和 Phe<sup>221</sup> 这 2 个突变位点位于  $\beta$ -turn 上, 筛选获得的突变体类型及效应与 Guruprasad 等人 (2000) 基于  $\beta$ -turn 结构处氨基酸残基偏爱性的统计结果高度吻合<sup>[18]</sup>, 说明筛选到的氨基酸残基类型有助于  $\beta$ -turn 构象的稳定。LipA-E<sup>35</sup>P 稳定性的提高得益于 Pro 降低了多肽链骨架的构象熵<sup>[19-20]</sup>。此外, F221D、V220E 和 L218E 3 个突变体均由非极性氨基酸残基突变为极性氨基酸残基, 突变后的氨基酸残基的溶剂可接近面积较原始氨基酸残基有显著提高, 有助于脂肪酶突变体在溶剂中的稳定。为进一步提高脂肪酶的稳定性, 在后续实验中, 将继续进行多个突变位点的迭代饱和和诱变, 继续优化其他  $\beta$ -turn 构象, 增加脂肪酶分子中的盐桥数量等。

值得关注的是: 在 LipA 分子中, 具有较高 B-factor 值的氨基酸残基密集分布于  $\beta$ 3 和  $\beta$ 4 这 2 个二级结构成分上。事实上, 与其他脂肪酶 3D 结构(如 *Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶 LipA) 比较分析发现,  $\beta$ 3 和  $\beta$ 4 这 2 个二级结构成分, 并不是维持脂肪酶 3D 构象的必需成分<sup>[21]</sup>。分子动力学模拟显示,  $\beta$ 3 和  $\beta$ 4 仅仅发挥了稳定  $\alpha$ 9 构象的功能<sup>[22]</sup>。在我们同期的其他实验中发现, 缺失  $\beta$ 3 和  $\beta$ 4 这 2 个二级结构成分, 严重影响脂肪酶 LipA 的活性(实验室未发表数据)。作为维持脂肪酶 3D 构象的非必需二级结构成分, 如何影响脂肪酶 LipA 的活性和稳定性, 其作用的分子机制还有待深入调查。

## 参考文献

- [1] Hough DW, Danson MJ. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3 (1) : 39-46.
- [2] Bordes F, Tarquis L, Nicaud JM, Marty A. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156 (2) : 117-124.
- [3] Yu XW, Wang R, Zhang M, Xu Y, Xiao R. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by *in vivo* recombination in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11:102.
- [4] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006, 45 (46) : 7745-7751.
- [5] Zhang JH, Lin Y, Sun YF, Ye YR, Zheng SP, Han SY. High-throughput screening of B factor saturation mutated *Rhizomucor miehei* lipase thermostability based on synthetic reaction. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50 (6-7) : 325-330.
- [6] Wen S, Tan T, Zhao H. Improving the thermostability of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 2012, 164 (2) : 248-253.
- [7] Shu ZY, Wu JG, Chen D, Cheng LX, Zheng Y, Chen JP, Huang JZ. Optimization of *Burkholderia* sp. ZYB002 lipase production for pitch control in thermomechanical pulping (TMP) processes. *Holzforschung*, 2012, 66 (3) : 341-348.
- [8] Shu ZY, Lin RF, Jiang H, Zhang YF, Wang MZ, Huang JZ. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107 (6) : 658-661.
- [9] Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA — a self-parameterizing force field. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2002, 47 (3) : 393-402.
- [10] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2007, 2 (4) : 891-903.
- [11] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (15) : 4836-4841.
- [12] Eijsink VGH, Vriend G, Vandervinne B, Hazes B, Vandenburg B, Venema G. Effects of changing the interaction between subdomains on the thermostability of *Bacillus* neutral proteases. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 1992, 14 (2) : 224-236.
- [13] Zhao HM, Arnold FH. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1999, 12

- (1) : 47-53.
- [14] Tyagi S, Pleiss J. Biochemical profiling in *silico* — predicting substrate specificities of large enzyme families. *Journal of Biotechnology*, 2006, 124 (1) :108-116.
- [15] Jochens H, Bornscheuer UT. Natural diversity to guide focused directed evolution. *ChemBioChem*, 2010, 11 (13) :1861-1866.
- [16] Kille S, Acevedo-Rocha CG, Parra LP, Zhang ZG, Opperman DJ, Reetz MT, Acevedo JP. Reducing codon redundancy and screening effort of combinatorial protein libraries created by saturation mutagenesis. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2 (2) : 83-92.
- [17] Tang LX, Gao H, Zhu XC, Wang X, Zhou M, Jiang RX. Construction of “small-intelligent” focused mutagenesis libraries using well-designed combinatorial degenerate primers. *BioTechniques*, 2012, 52 (3) :149-158.
- [18] Guruprasad K, Rajkumar S. Beta-and gamma-turns in proteins revisited: a new set of amino acid turn-type dependent positional preferences and potentials. *Journal of Biosciences*, 2000, 25 (2) :143-156.
- [19] Prajapati RS, Das M, Sreeramulu S, Sirajuddin M, Srinivasan S, Krishnamurthy V, Ranjani R, Ramakrishnan C, Varadarajan R. Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability. *Proteins*, 2007, 66 (2) : 480-491.
- [20] Matthews BW, Nicholson H, Becktel WJ. Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987, 84 (19) : 6663-6667.
- [21] Nardini M, Lang DA, Liebeton K, Jaeger KE, Dijkstra BW. Crystal structure of *pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I. 1 of bacterial lipases. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (40) : 31219-31225.
- [22] Barbe S, Lafaquière V, Guieysse D, Monsan P, Remaud-Siméon M, André I. Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 2009, 77 (3) : 509-523.

## Screening for mutants with thermostable lipase A from *Burkholderia* sp. ZYB002

Yanru Liu<sup>\*</sup>, Liqing Qiu, Jianzhong Huang, Bingchun Zhao, Zuozhen Wang, Xiaolan Zhu, Yuanyuan Gao, Zhengyu Shu<sup>\*</sup>

National & Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology; Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] We improved the thermostability of LipA from *Burkholderia cepacia* ZYB002 by protein engineering technology to expand the application of lipase LipA. [Method] On the basis of B-factor value of lipase LipA, series of potential mutation hotspots were selected for iterative saturation mutagenesis and the corresponding small mutation gene libraries were then constructed to screen the hyperthermal variants. [Results] From the above mutation libraries, we obtained a series of mutants whose enzyme half-life at 55°C increased by 1.7 to 2.2-fold. [Conclusion] B-factor iterative test (B-FIT) is feasible to mutate thermostable strains.

**Keywords:** thermostability, B-factor, saturation mutagenesis, lipase LipA, *Burkholderia* sp.

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Funds of China (31370802), by the Key Project from Science and Technology Bureau of Fujian Province (2013H0021) and by the Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar of Fujian Province (2009J06013)

<sup>\*</sup> Corresponding author. Yanru Liu, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: yrliu@fjnu.edu.cn; Zhengyu Shu, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: shuzhengyu@fjnu.edu.cn

Received: 7 November 2014 / Revised: 20 January 2015