

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (8) :1060 – 1067; 4 August 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140599

易错 PCR 法提高土芽孢杆菌 ZH1 羧酸酯酶的热稳定性

刘韩¹, 吴丽云¹, 高贺¹, 倪辉^{1,2,3}, 蔡慧农^{1,2,3}, 朱艳冰^{1,2,3*}

¹ 集美大学食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021

² 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021

³ 厦门市食品与生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021

摘要: 【目的】对土芽孢杆菌 (*Geobacillus* sp.) ZH1 的羧酸酯酶基因进行定向进化, 筛选得到酶热稳定性提高的突变酶。【方法】利用易错 PCR 技术向羧酸酯酶基因中随机引入突变, 建立酶基因突变文库, 筛选获得热稳定性提高的突变体, 并对突变酶进行诱导表达、纯化及部分酶学性质研究。【结果】通过筛选, 获得羧酸酯酶热稳定性提高的突变菌株 65。序列分析表明, 突变酯酶 65 有 2 个氨基酸发生了改变, 包括 T113S 和 M160K。突变酶的三维结构模拟显示, 突变 T113S 位于酶分子的第 5 个 β -折叠上; 突变 M160K 处在酶分子第 5 个和第 6 个 α -螺旋之间的环结构上, 位于酶分子表面, 突变后的 Lys160 与邻近的 Thr162 形成一个额外氢键。在 90 °C 下, 突变酶 65 和亲本酶的半衰期分别为 3.1 h 和 1.9 h, 表明筛选到的突变酶 65 比亲本酶的热稳定性好。【结论】基于易错 PCR 技术对 *Geobacillus* sp. ZH1 羧酸酯酶的热稳定性进行了定向进化, 对改善酶的性质、扩大酯酶的应用范围, 以及研究酯酶的结构与功能的关系具有重要意义。

关键词: 定向进化, 易错 PCR, 羧酸酯酶, 热稳定性

中图分类号: Q93 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 08-1060-08

酯酶广义上是指具有催化水解酯键能力的一类水解酶的统称^[1], 其主要分成两类: 羧酸酯酶 (EC 3.1.1.1) 和脂肪酶 (EC 3.1.1.3), 而通常所说的酯酶往往指羧酸酯酶, 主要用来催化水解脂肪酸族及芳香族酯类的化合物。一般来说, 脂肪酶催化水不溶性、长链酰基甘油酯 (酰基链碳原子数大于 10) 的水解及合成, 而羧酸酯酶对水溶性、短链酰基甘油酯 (酰基链碳原子数小于 10) 的活力较强。作为一种重要的工业酶类, 酯酶可以催化酯水解、酯合成、酯交换等具有重要应用价值的反应, 并具有良好的区域选择性和立体选择性, 广泛应用于医药、化工、食

品、能源及环境保护等领域^[2]。

酯酶普遍存在于动物、植物和微生物中。一般的酯酶热稳定性差, 易失活。增强酯酶的热稳定性可以扩大其在制药和化工等领域的应用范围。已有一些提高酯酶热稳定性的研究报道^[3-4]。本研究室在 2012 年从土芽孢杆菌 (*Geobacillus* sp.) ZH1 中克隆得到羧酸酯酶基因 (GenBank 收录号为 JF803806), 并在大肠杆菌中成功表达, 并对重组酶的酶学性质进行了较全面的研究^[5]。该羧酸酯酶具有一定的热稳定性, 除了十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 和二甲苯, 它对测试的其它去

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31401632); 集美大学科研创新团队基金项目 (2010A006)

* 通信作者。Tel: +86-592-6181736; E-mail: yanbingzhu@163.com

作者简介: 刘韩 (1992 -), 男, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要研究方向为蛋白质化学。E-mail: 2005liuhan2008@163.com

收稿日期: 2014-12-18; **修回日期:** 2015-04-26

垢剂和有机溶剂具有良好抗性。为了获得更高热稳定性的羧酸酯酶, 本文拟采用易错 PCR 技术向该酶基因中随机引入突变, 建立羧酸酯酶基因突变文库, 再结合固蓝 RR 顶层琼脂筛选法^[6], 获得热稳定性提高的羧酸酯酶突变株, 并对突变羧酸酯酶的酶学性质进行研究。提高羧酸酯酶的热稳定性, 不仅可以扩大其在工业上的应用范围, 还对理解羧酸酯酶的结构和功能之间的关系具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和 DL2000 DNA 标准购自 TaKaRa 公司; 引物合成和 DNA 测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成; *Bam*H I、*Hind* III 和 T_4 DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品; SanPrep 柱式质粒 DNA 提取试剂盒和 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Ni Sepharose 6 Fast Flow 为 GE Healthcare Life Sciences 公司产品; 对硝基苯酯 (pNPC₂、pNPC₄、pNPC₈、pNPC₁₀、pNPC₁₂、pNPC₁₄ 和 pNPC₁₆) 为 Sigma 公司产品; 其余试剂均为国产或进口分析纯。冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品; 隔水恒温培养箱购自上海浦东荣丰科学仪器有限公司; 恒温培养振荡器购自上海智城分析仪器制造有限公司。

1.1.2 菌株和质粒: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存; 原核表达载体 pET-28a 为 Novagen 产品。

1.2 易错 PCR 扩增

以含 *Geobacillus* sp. ZH1 羧酸酯酶的重组质粒 (pET-28a-est)^[5] 为模板, 利用易错 PCR 向羧酸酯酶基因 *est* 中随机引入突变。特异基因的上游引物序列为 5'-CGCGGATCCAAGATTGTTCCGCCGAAG-3' (划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), 下游引物序列为 5'-GCCAAGCTTCCAATCTAACGATTCGAAG-3' (划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。50 μ L 易错 PCR 体系包含 5 μ L 10 \times *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 (无 Mg²⁺)、7 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L dATP 和 dGTP、1 mmol/L dCTP 和 dTTP、基因特异性上游和下游引物各 0.2 μ mol/L、*Taq* DNA 聚合酶 2.5 U、2 ng pET-

28a-est 重组质粒模板。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并采用 DNA 胶回收试剂盒进行纯化。

1.3 突变文库的构建

用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别对纯化的易错 PCR 产物和质粒 pET-28a 进行酶切, 酶切后的 PCR 产物和表达载体连接后, 转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在 10 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 提取质粒。将质粒转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h, 构成突变文库。

1.4 产热稳定羧酸酯酶克隆的初步筛选

用灭菌牙签将 LB 平板上生长出的卡那霉素抗性转化子分别点种至两种平板, 并进行编号。一种为 LB 固体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 作为保存平板; 另一种为 LB 固体培养基 [含 50 μ g/mL 卡那霉素和 0.25 mmol/L 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)], 作为筛选平板。同时将含有菌株 ZH1 羧酸酯酶重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 作为对照菌点种在筛选平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 后, 将平板在 70 $^{\circ}$ C 放置 5 h, 然后利用固蓝 RR 顶层琼脂法^[6]进行筛选。将平板上的菌落覆盖含有 15 mg/mL 固蓝 RR 和 45 mg/mL 乙酸- α -萘酯的 0.6% 软琼脂, 产酯酶克隆呈现棕色^[7]。与对照菌相比较, 选取菌落变色快、棕色深的菌株作为初筛目的菌株。

1.5 目的菌株的复筛及鉴定

将初筛菌株的单菌落分别接种至 2 mL LB 培养基 (含卡那霉素 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 16 h。培养物按 1:100 转接于 2 mL LB 培养基 (含卡那霉素 50 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至细菌生长对数中期 (OD_{600} 值达 0.5), 加入 IPTG 至终浓度 0.25 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 6 h。取 500 μ L 菌液, 10000 \times g 离心 1 min, 去上清, 用 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 洗涤菌体, 10000 \times g 离心 1 min。菌体加入 500 μ L 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 菌体悬浮后, 在冰浴条件下进行超声波破菌。12000 \times g 离心 10 min, 取上清, 即得粗酶液。以对硝基苯酚丁酸酯 (p-nitrophenyl butyrate, pNPC₄) 为底物, 按文献^[5]的方法测定粗酶液的酯酶活力。将粗酶液在

70 °C 热处理 3 h 后,测定粗酶的热稳定性。选取酶的活力不降低,但热稳定性提高的菌株。复筛的目的菌株利用菌落 PCR 验证后进行测序分析。

1.6 酯酶在 *E. coli* 中的诱导表达与分离纯化

菌株接种于 200 mL LB 培养基(含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),加入 IPTG (终浓度为 0.25 mmol/L),37 °C 诱导表达 6 h 后,4 °C、5000 \times g 离心 5 min,弃上清,菌体用 15 mL 预冷的缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 15 mmol/L 咪唑, pH8.0)重悬,在冰浴条件下超声破菌后,4 °C、10000 \times g 离心 20 min,获得上清液。上清液与适量 Ni Sepharose 6 Fast Flow 置于 4 °C 结合反应 30 min 后,用洗涤缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, pH8.0)进行洗涤。最后利用洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH8.0)将目的蛋白洗脱。纯化蛋白质的纯度及分子量经 SDS-PAGE 分析,通过 BandScan 凝胶电泳分析系统分析目的蛋白的表达量。目的蛋白经 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)透析后,利用 Bradford 法进行蛋白质浓度测定,用于后续的酶学性质研究。

1.7 突变酯酶的酶学性质研究

酶的活力测定方法参见文献 [5]。纯化后的酯酶用于酶的底物特异性、最适作用温度、最适作用 pH 以及动力学参数(K_m 、 V_{\max} 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m)测定的研究,方法参见文献 [5]。进行酶的热稳定性研究时,将酶液分别置于 60、70、80 和 90 °C 下放置 2.5、3.5 和 4.5 h 后,测定酶的残余活力,以未经处理的酶活力为 100%。

1.8 酯酶的结构分析

蛋白质的二级结构预测利用 SOPMA 程序分析 [8]。以来自 *Geobacillus stearothermophilus* 的羧酸酯酶(PDB 收录号 1tqh.1)为模板,利用 SWISS-MODEL [9] 进行突变酯酶的同源建模。蛋白质的三维结构及氢键的分析利用 Pymol 软件进行。

2 结果和分析

2.1 易错 PCR 突变库的建立及热稳定性提高酯酶克隆的筛选

本研究的易错 PCR 中,将 dCTP 和 dTTP 的浓度提高至 1 mmol/L 来促进碱基错配的倾向性,以高达

7 mmol/L 的 Mg^{2+} 来稳定非互补的碱基对,通过这两方面的调整来得到合适频率的突变文库。构建的突变文库的容量约为 3.0×10^4 。随机挑选 10 个克隆,经过测序鉴定,碱基突变率为 0.34%,即每个基因序列有 2-3 个碱基突变,达到了构建文库的突变频率要求。以平板显色为初筛方法,选取菌落迅速变为深棕色的克隆,共筛选到目的菌株 80 株。将初筛的菌株进行发酵培养后,进行粗酶的酶活力及热稳定性分析,以酯酶活力保持且热稳定性提高为原则,筛选得到 1 株热稳定性提高最大的菌株,命名为突变菌株 65,作为后续的研究对象。

2.2 突变酯酶的突变位点分析

突变菌株 65 的目的基因测序后,将突变酶 65 与亲本酶的基因序列进行比对分析,发现突变酶 65 有 2 个碱基发生了突变,均为 A 和 T 之间的颠换,包括 A337T 和 T479A。蛋白质序列发生变化,突变位点分别为 T113S 和 M160K。

2.3 突变酯酶的诱导表达及分离纯化

突变酶 65 基因编码蛋白质的理论分子量大小为 28.156 kDa。突变菌株 65 经 IPTG 诱导表达,在 40 kDa 左右有明显的融合蛋白表达条带。菌体裂解后,将获得的裂解上清液过 Ni Sepharose 6 Fast Flow 亲和层析柱进行分离纯化,得到重组蛋白,分子量为 40.3 kDa,与重组亲本酶的分子量(40.4 kDa) [5] 基本一致。利用 BandScan 软件分析,突变酶 65 和亲本酶的表达量占菌体总蛋白的相对含量分别为 38.4% 和 37.5%,它们在大肠杆菌细胞中的表达量并没有显著差异。

2.4 突变酯酶的酶学性质

2.4.1 酯酶的底物特异性及活力:突变酶和亲本酶对不同酰基链长的对硝基苯酯的水解能力结果如图 1 所示,两者都作用于短链脂肪酸酯,所以均为羧酸酯酶。突变酶 65 以 pNPC_4 为底物的活力最高(10.2 U/mg),以 pNPC_2 为底物时的相对酶活力为 70.5%;以 pNPC_{12} 、 pNPC_{14} 和 pNPC_{16} 为底物时,突变酶没有活力。亲本酶以 pNPC_2 为底物的活力最高(9.8 U/mg),以 pNPC_4 为底物时酶活力达 8.9 U/mg [5]。所以,以 pNPC_4 为底物时,与亲本酶相比,突变酶的活力未降低。

2.4.2 酯酶的最适作用温度:在不同温度下测定酯酶的活力,结果如图 2 所示。与亲本酶相比,突变酶 65 的最适作用温度未改变,仍为 60 °C。突变酶

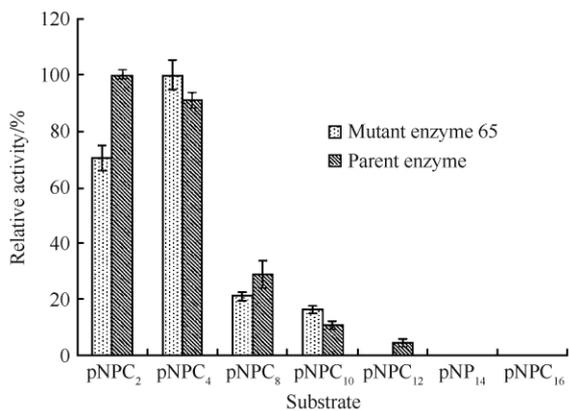


图 1. 亲本酶和突变酶 65 的底物特异性

Figure 1. Substrate specificity of parent enzyme and mutant enzyme 65.

在 40 °C 和 50 °C 时的相对酶活力低于亲本酶,但是在 70、80 和 90 °C 时的相对酶活力高于亲本酶。

2.4.3 酯酶的热稳定性: 亲本酶和突变酶 65 的热稳定性对比分析(图 3)显示,突变酶 65 和亲本酶的酶活力都随着温度和时间的不断增加而降低。在

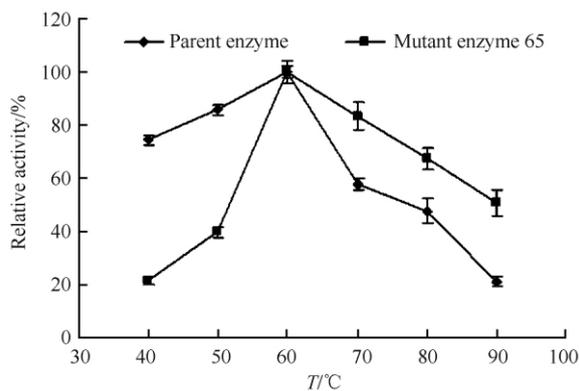


图 2. 亲本酶和突变酶 65 的最适作用温度

Figure 2. Optimum temperature of parent enzyme and mutant enzyme 65.

60 °C 下处理 2.5 h, 对突变酶 65 几乎没有影响,而亲本酶的残余活力为 90.0%;在 60 °C 下处理 4.5 h, 突变酶 65 和亲本酶的残余活力分别为 90.4% 和 71.2%。在 70 °C 下处理 4.5 h, 突变酶 65 具有 73.4% 的酶活力,而亲本酶仅具有 45.1% 的酶活

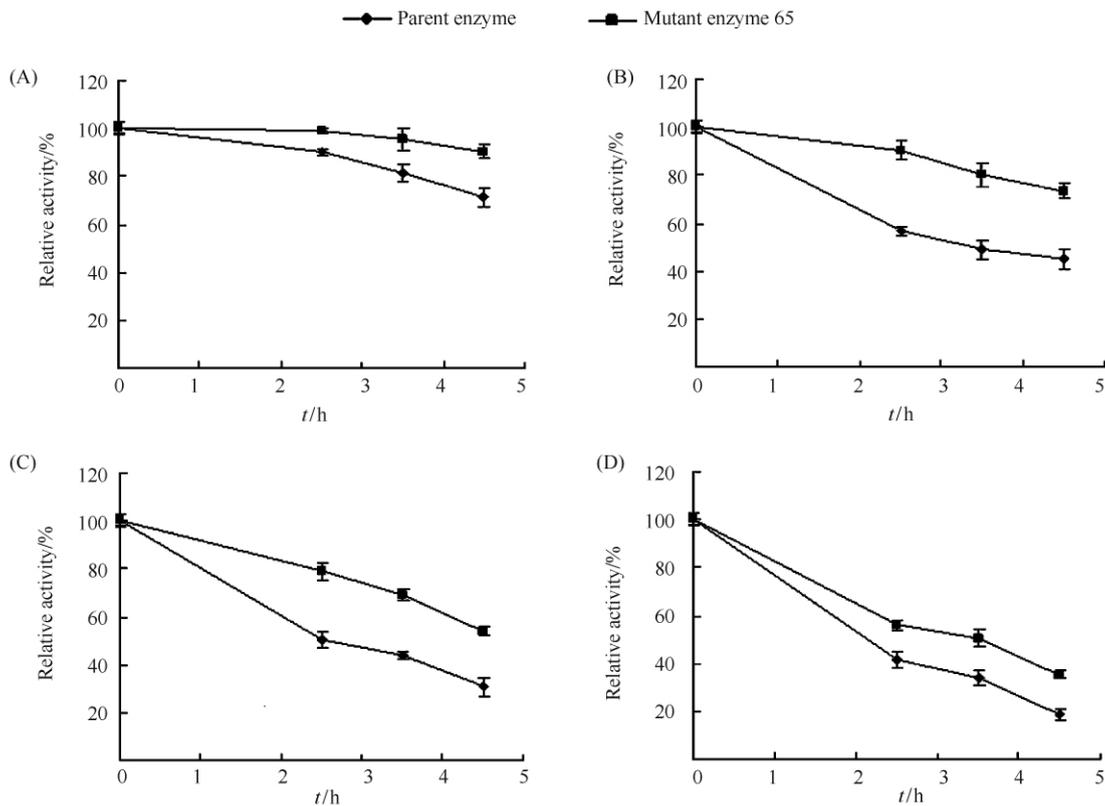


图 3. 温度对亲本酶和突变酶 65 热稳定性的影响

Figure 3. Effect of temperature on the thermal stability of parent enzyme and mutant enzyme 65. A: Thermostability after incubation at 60 °C; B: Thermostability after incubation at 70 °C; C: Thermostability after incubation at 80 °C; D: Thermostability after incubation at 90 °C.

力。在 80 °C 下处理 4.5 h, 突变酶 65 和亲本酶的残余活力分别为 53.8% 和 30.9%。在 90 °C 下, 酶的失活符合一级反应, 突变酶 65 和亲本酶的热失活半衰期 ($t_{1/2}$) 分别为 3.1 h 和 1.9 h。由此可见, 突变酶 65 的热稳定性比亲本酶高。

2.4.4 酯酶的最适反应 pH: 在不同 pH 条件下测定酯酶的活力, 结果如图 4 所示。与亲本酶相比, 突变酯酶 65 的最适反应 pH 不变, 为 8.0; 在 pH6.0 - 7.5 的范围内, 突变酶 65 的相对酶活力低于亲本酶; pH8.0 - 9.5 时, 突变酶 65 和亲本酶的相对酶活力基本一致。在 pH7.5 - 9.0 的范围内, 突变酶 65 保持了 60% 以上的活力; 在 pH 高于 9.0 时, 突变酯酶 65 的活力急剧下降, 在 pH9.5 时, 突变酯酶 65 只有 15.8% 的相对活力; 在 pH5.5 时, 突变酯酶 65 几乎没有活性。

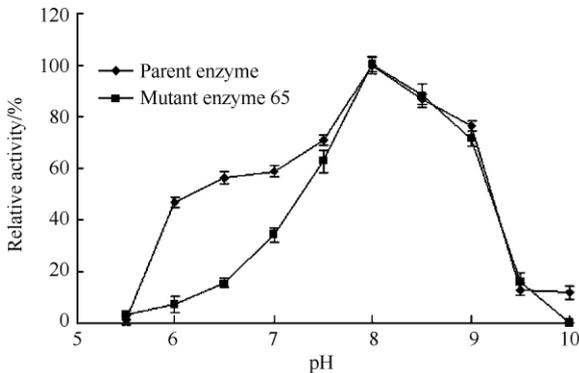


图 4. 亲本酶和突变酶 65 的最适反应 pH

Figure 4. Optimum pH of parent enzyme and mutant enzyme 65.

2.4.5 酯酶的动力学参数: 分别以不同浓度的 pNPC₂ 和 pNPC₄ 为底物, 确定酯酶的动力学参数。如表 1 所示, 与亲本酶相比, 突变酯酶 65 对 pNPC₂ 和 pNPC₄ 的 K_m 值均降低, 突变酶 65 对 pNPC₄ 的 K_m 最低, 为 0.793 mmol/L。亲本酶的 V_{max} 高于突变酶 65, 两者对 pNPC₂ 的 V_{max} 都高于以 pNPC₄ 为底物时。以 pNPC₂ 为底物时, 亲本酶的 k_{cat} 高于突变酶 65, 但是以 pNPC₄ 为底物时, 两者差别不大。以 pNPC₂ 和 pNPC₄ 为底物时, 突变酶 65 的催化效率 (k_{cat}/K_m 值) 均高于亲本酶。

2.5 突变羧酸酯酶的结构

二级结构的预测结果 (表 2) 表明, 突变酶 65 的 α -螺旋和 β -折叠的比例略微降低, β -转角和无规则卷曲的比例少量增大。以来自嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 的羧酸酯酶 (PDB 收

录号 1tqh. 1. A) 为模板, 利用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的同源建模, 模板与突变酶 65 的氨基酸序列相似性达 96.75%。突变羧酸酯酶 65 的三维结构见图 5 (图中标出的氨基酸突变位点的位置由起始密码子 ATG 开始翻译的蛋白质算起), 该蛋白质的核心具有典型的 α/β 水解酶的结构域, Ser93、Asp192 和 His222 构成了突变羧酸酯酶的催化三联体。

表 1. 亲本酶和突变酶 65 的动力学参数

Table 1. Kinetic parameters for parent enzyme and mutant enzyme 65

Kinetic parameters	Mutant enzyme 65		Parent enzyme	
	pNPC ₂	pNPC ₄	pNPC ₂	pNPC ₄
$K_m / (\text{mmol/L})$	1.123	0.793	3.200	1.187
$V_{max} / [\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})]$	19.57	17.54	39.31	21.30
$k_{cat} / (\text{s}^{-1})$	540.9	484.8	909.6	493.0
$k_{cat}/K_m / [(\text{L}/(\text{mmol}\cdot\text{s}))]$	481.7	611.3	284.3	415.3

表 2. 亲本酶和突变酶 65 二级结构的预测

Table 2. The second structure prediction of parent enzyme and mutant enzyme 65

Enzymes	$c(\alpha\text{-helix})$	$c(\beta\text{-strand})$	$c(\beta\text{-turn})$	$c(\text{Random coli})$
	%	%	%	%
Mutant enzyme 65	46.34	15.04	3.66	34.96
Parent enzyme	46.75	15.85	3.25	34.15

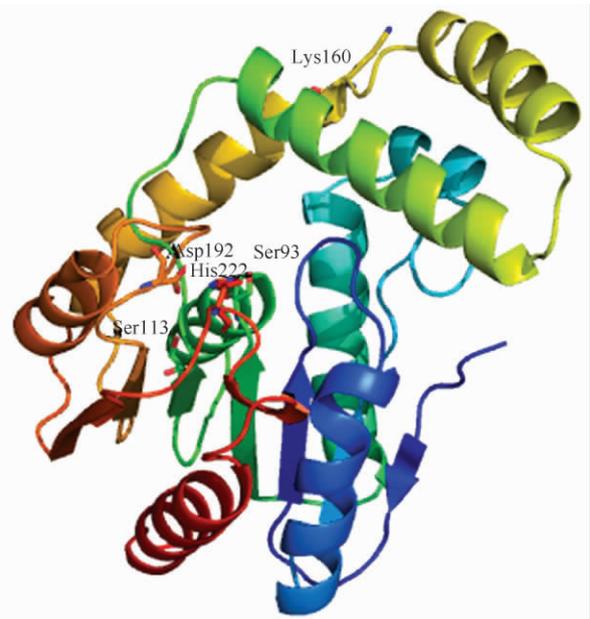


图 5. 突变酯酶 65 的三维结构模拟图

Figure 5. Schematic representation of the three-dimensional structure model of mutant esterase 65.

两个突变位点中的 T113S 在空间结构上位于酶分子内部, 在第 5 个 β -折叠上。该突变未引起氨基酸残基性质及酶结构的明显改变(结构未示)。另一个突变点 M160K 在第 5 个 α -

螺旋和第 6 个 α -螺旋之间的环结构上, 处于酶分子表面, 该突变位点由 Met 突变为 Lys, 突变后的 Lys160 与 Thr162 形成一个额外氢键(图 6)。

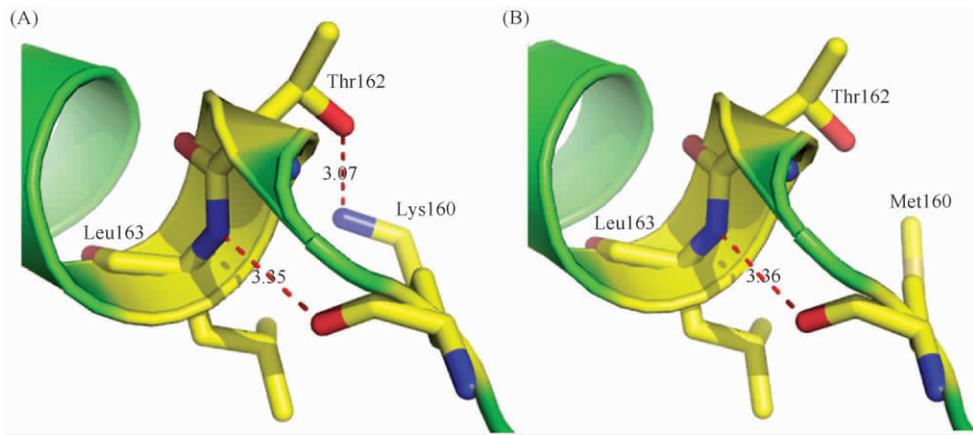


图 6. 突变位点 Lys160 引起的氢键变化

Figure 6. Hydrogen bond changes caused by mutant site Lys160. A: Hydrogen bonds around Lys160 in mutant esterase 65; B: Hydrogen bonds around Met160 in parent esterase.

3 讨论

酶分子定向进化^[10]就是在实验室中人为创造特殊的进化条件, 模拟自然进化机制(如突变、重组、自然选择), 在体外改造酶基因, 构建酶分子突变库并定向筛选出所需性质的非天然酶蛋白。本文利用易错 PCR 在 *Geobacillus* sp. ZH1 羧酸酯酶基因中引入随机突变, 并利用高效的固蓝 RR 顶层琼脂法从突变文库中成功地筛选出一株热稳定性提高的突变株 65。

将突变株 65 进行诱导表达, 纯化得到突变酯酶 65。突变酶 65 与亲本酶的底物特异性^[5]相似, 两者都作用于短链脂肪酸酯, 为羧酸酯酶。突变酶 65 以 pNPC₄ 为底物时的活力较亲本酶高, 但亲本酶以 pNPC₂ 为底物时的活力高于突变酶 65。与亲本酶的动力学参数^[5]相对比, 以 pNPC₂ 和 pNPC₄ 为底物时, 突变羧酸酯酶 65 的 K_m 值降低, 说明其对底物的亲和力提高。亲本酶以 pNPC₂ 为底物时的 k_{cat} 值远高于突变酶 65, 说明前者对该底物的催化效率更高, 但两者以 pNPC₄ 为底物时的 k_{cat} 值差别不大。

与亲本酶的酶学性质^[5]相对比, 突变羧酸酯酶

65 的最适温度和最适反应 pH 没有改变, 仍为 60 °C 和 pH8.0。本文中的热稳定分析结果表明, 突变酶 65 比亲本酶的热稳定性有较大提高。在 90 °C 下处理 4.5 h, 突变酶 65 和亲本酶的相对剩余活力分别为 35.4% 和 18.6%。蛋白质的热稳定性与带电荷残基、疏水氨基酸残基、盐键、氢键、疏水相互作用等因素有关^[11-14]。本文中, 突变酶 65 中的 Ser113 突变位点未引起氨基酸残基性质的明显改变, 通过与突变前蛋白质的三级结构相比对, 该突变位点对羧酸酯酶热稳定的贡献可能不大。160 位的氨基酸位于酶分子表面, 在第 5 个 α -螺旋和第 6 个 α -螺旋之间的环结构上, 由 Met 突变为碱性氨基酸 Lys, 蛋白质表面带电荷残基数目增加, 而且突变亦增加了一个额外氢键, 有助于稳定该环结构, 从而使蛋白质的稳定性提高。以上推论还需要具体的实验进行验证。

易错 PCR^[15]以其操作简单、有效等优点成为目前应用最为广泛的进化手段之一。本研究利用易错 PCR 定向进化了 *Geobacillus* sp. ZH1 羧酸酯酶的热稳定性, 在今后的研究中可以在此基础上进一步结合其他方法, 例如 DNA shuffling、理性设计^[16]或半理性设计^[17]来进一步提高酶的热稳定性。

参考文献

- [1] Arpigny J, Jaeger K. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 1999, 343: 177-183.
- [2] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26 (1): 73-81.
- [3] Gall MG, Nobili A, Pavlidis IV, Bornscheuer UT. Improved thermostability of a *Bacillus subtilis* esterase by domain exchange. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98 (4): 1719-1726.
- [4] Kim JH, Choi GS, Kim SB, Kim WH, Lee JY, Ryu YW, Kim GJ. Enhanced thermostability and tolerance of high substrate concentration of an esterase by directed evolution. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2004, 27 (4/6): 169-175.
- [5] Zhu Y, Liu G, Li H, Liu J, Bai X, Guan R, Cai H. Cloning and characterization of a thermostable carboxylesterase from inshore hot spring thermophile *Geobacillus* sp. ZH1. *Acta Oceanologica Sinica*, 2012, 31 (6): 117-126.
- [6] Khalameyzer V, Fischer I, Bornscheuer U, Altenbuchner J. Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (2): 477-482.
- [7] Kim JY, Choi GS, Kim YJ, Ryu YW, Kim GJ. A new isolate *Bacillus stearothermophilus* JY144 expressing a novel esterase with high enantioselectivity to (R)-ketoprofen ethyl ester: strain selection and gene cloning. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 18 (1): 133-145.
- [8] Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Computer Applications in the Biosciences: CABIOS*, 1995, 11 (6): 681-684.
- [9] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 2006, 22 (2): 195-201.
- [10] Dalby PA. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 2011, 21 (4): 473-480.
- [11] Bagautdinov B, Yutani K. Structure of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Thermus thermophilus* HB8: implications for thermal stability. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2011, 67 (12): 1054-1064.
- [12] Chakravarty S, Varadarajan R. Elucidation of factors responsible for enhanced thermal stability of proteins: a structural genomics based study. *Biochemistry*, 2002, 41 (25): 8152-8161.
- [13] Delboni LF, Mande SC, Turley S, Hol WJ, Delrue FR, Mainfroid V, Martial JA, Vellieux FM. Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in six isomerases with known three-dimensional structures points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Science*, 1995, 4 (12): 2594-2604.
- [14] Vogt G, Woell S, Argos P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *Journal of Molecular Biology*, 1997, 269 (4): 631-643.
- [15] Wang R, Yu XY, Sha C, Xu Y. Increasing activity of *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 lipase by directed evolution-error prone PCR. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (12): 1892-1899. (in Chinese) 王睿, 喻晓蔚, 沙冲, 徐岩. 定向进化-易错 PCR 方法提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的活力. *生物工程学报*, 2009, 25 (12): 1892-1899.
- [16] Yi ZL, Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Design of mutants for enhanced thermostability of β -glycosidase BgIY from *Thermus thermophilus*. *Bioresource Technology*, 2013, 129: 629-633.
- [17] Khersonsky O, Rothlisberger D, Wollacott AM, Murphy Paul, Dym O, Albeck S, Kiss G, Houk KN, Baker D, Tawfik DS. Optimization of the in-silico-designed kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 407 (3): 391-412.

Improving thermal stability of *Geobacillus* sp. ZH1 carboxylesterase by error-prone PCR

Han Liu¹, Liyun Wu¹, He Gao¹, Hui Ni^{1,2,3}, Huinong Cai^{1,2,3}, Yanbing Zhu^{1,2,3*}

¹ College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian Province, China

² Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, Fujian Province, China

³ Research Center of Food Biotechnology of Xiamen City, Xiamen 361021, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] This study was aimed to improve the thermal stability of carboxylesterase from *Geobacillus* sp. ZH1 by directed evolution. [Methods] A library of carboxylesterase mutants was constructed by introducing random mutagenesis using error-prone PCR to screen mutant enzymes with improved thermostability. After induction, expression and purification, the mutant enzyme was characterized. [Results] After screening, one mutant strain 65 was obtained with improved carboxylesterase thermal stability. Sequence analysis revealed two amino acid substitutions, including T113S and M160K. According to homologous modeling, T113S was located on the fifth β -sheet. Another mutant site M160K was located on a loop between the fifth and the sixth α -helix, being on the surface of the mutant enzyme. The mutated Lys160 formed an extra hydrogen bond with nearby Thr162. The half-life of mutant enzyme 65 and the parent enzyme at 90 °C was 3.1 h and 1.9 h, respectively. The mutant enzyme 65 had a better thermal stability than the parent enzyme. [Conclusion] Directed evolution by error-prone PCR of *Geobacillus* sp. ZH1 carboxylesterase gene is effective to improve the thermal stability.

Keywords: directed evolution, error-prone PCR, carboxylesterase, thermal stability

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401632) and by the Scientific Research Innovation Team Foundation of Jimei University (2010A006)

* Corresponding author. Tel: +86-592-6181736; E-mail: yanbingzhu@163.com

Received: 18 December 2014/Revised: 26 April 2015