



理性设计盐桥构建伯克霍尔德菌脂肪酶热稳定突变体

刘艳如^{*}, 赵丙春, 董盼盼, 邱黎清, 黄建忠, 朱晓兰, 王作镇, 舒正玉^{*}

福建师范大学 生命科学学院, 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, 福建 福州 350108

摘要:【目的】借助蛋白质工程技术提高伯克霍尔德菌 ZYB002 脂肪酶 LipA 的热稳定性, 以期更好地将其应用于工业生产中。【方法】利用 YASARA、FoldX、Rosetta、Gromacs 等生物信息学软件, 构建 1 个脂肪酶 LipA 的热稳定性提高的微型突变体电子文库; 通过对突变体的结构信息和自由能变化进行评估, 筛选出潜在的有价值的突变体。继而利用基因定点突变技术, 构建上述候选突变体的突变基因文库, 通过实验筛选出热稳定性提高的脂肪酶 LipA 突变体。【结果】利用上述方法, 从构建的 20 个脂肪酶 LipA 突变体中, 筛选到热稳定性有显著提高的 3 个突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp、LipA-Asn¹²⁵Glu 和 LipA-Gln²⁶²Glu。经 55 °C 处理 12 min 后, 上述 3 个突变体的 T_{50}^{12} 值较野生型分别提高 4.0 °C、5.5 °C 和 4.4 °C; 在 55 °C 下的半衰期较野生型分别提高了 2.2 倍、3.8 倍和 2.6 倍。【结论】利用生物信息学软件, 构建脂肪酶 LipA 突变体电子文库, 结合蛋白质的结构信息, 可以快速筛选到热稳定性提高的脂肪酶 LipA 突变体。

关键词: 伯克霍尔德菌, 脂肪酶 A, 电子设计与筛选, 盐桥, 热稳定性突变体

微生物脂肪酶(Triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3)又名三酰甘油酯水解酶, 是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和脂肪酸的生物催化剂。作为一种非水相酶, 脂肪酶已被广泛应用到食品加工、精细化工、生物能源及制药等诸多领域, 具有重要的经济价值^[1]。大量微生物脂肪酶

资源陆续被挖掘、开发, 以 *Candida antarctica* 脂肪酶 B、*Burkholderia cepacia* 脂肪酶 A 和 *Rhizopus oryzae* 脂肪酶为代表的系列脂肪酶均已实现了商业化生产^[2]。到目前为止, 已开发的脂肪酶多为中温脂肪酶, 欠佳的热稳定性一定程度上制约了脂肪酶的规模化工业应用。虽然近些年来陆续有嗜

基金项目: 国家自然科学基金(31370802, 30870545); 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)

^{*}通信作者。刘艳如, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: yliu@fjnu.edu.cn; 舒正玉, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: shuzhengyu@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-01; 修回日期: 2016-11-11; 网络出版日期: 2016-12-02

热脂肪酶或耐热脂肪酶资源的零星报道^[3-4], 但极端脂肪酶到目前为止, 尚未实现工业化生产及大规模工业化应用。

快速获得具有良好热稳定性的突变体酶分子, 一直是生物催化剂领域诸多专家(包括学界和业界)的追求目标。近些年来, 基于蛋白质工程技术实现快速筛选或构建热稳定的酶分子, 得到迅猛发展, 诞生了系列新方法新技术。以 Reetz 教授为代表的科学家基于酶分子氨基酸残基 B-factor 值的大小作为筛选影响酶分子热稳定性的潜在氨基酸残基突变位点的标准, 继而利用迭代饱和突变技术 (Iterative saturation mutagenesis), 极大地缩小了突变文库容量, 可快速筛选出理想的热稳定性突变体^[5-6]。随着越来越多蛋白质晶体结构的解析及生物信息学的迅猛发展, 通过构建电子文库, 并以 $\Delta\Delta G^{\text{Fold}}$ 数值高低及突变体结构模型作为筛选标准, 能进一步缩小突变文库的数量。Floor 等利用此方法, 从仅含 150 个突变体的突变库中快速筛选到表观熔点温度 (Apparent melting temperature) 提高了 23 °C, 60 °C 下半衰期延长了 200 倍的卤代烷烃脱卤酶 (Haloalkane dehalogenase) 热稳定性突变体^[7]。在酶分子 3D 结构信息指导下, 还可直接理性设计出热稳定性突变体。如 Zhou 等利用来自于嗜热水解酶的结构模体 (motif) 置换中温脂肪酶的相应模体获得的脂肪酶突变体, 50 °C 下的温度稳定性提高了 100 倍^[8]。

本课题组自主分离筛选到 1 株脂肪酶高产菌株, 经鉴定并命名为伯克霍尔德菌 ZYB002 (*Burkholderia* sp.)^[9]。在前期研究中, 该菌株分泌的胞外脂肪酶 LipA, 在 TMP 纸浆造纸工艺中, 可有效分解纸浆中的树脂成分, 对控制树脂障碍具有一定的潜在

价值^[10]。为进一步提高该脂肪酶的应用效果, 有必要利用蛋白质工程技术提高其热稳定性(机械浆温度高达 80 °C)。本文报道利用生物信息学软件设计、筛选潜在的 *Burkholderia* sp. ZYB002 脂肪酶热稳定性突变体; 通过基因定点突变技术, 获得重组突变体蛋白, 筛选到性能优良的热稳定性突变体, 实验验证了该技术的可行性和有效性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体: *Burkholderia* sp. ZYB002 菌株由本实验室从油污土壤中分离鉴定并保存^[9]; 脂肪酶编码基因 *lipA* 及其对应的伴侣蛋白编码基因 *lipB* 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* 及重组表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)-pACYC-*lipA/lipB* 由本实验室构建并保存^[11]。

1.1.2 工具酶、引物及试剂: PrimeSTAR HS DNA Polymerase、QuickCut *Dpn* I 限制性内切酶及标准分子量的 DNA Marker 均购于宝生物工程(大连)有限公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒购于普洛麦格(北京)生物技术有限公司; 4-硝基苯月桂酸酯 (*p*-Nitrophenyl laurate, *p*NPL) 购于 Sigma (美国)公司; 氯霉素购于鼎国生物技术有限公司(北京); 其他试剂均为市售分析纯。本实验使用的引物对如表 1。

1.2 影响脂肪酶 LipA 热稳定性的潜在突变位点的筛选

影响脂肪酶 LipA 热稳定性的潜在突变位点筛选方法如下: (1) 脂肪酶 LipA 三级结构模型的模

表 1. 本实验使用的 PCR 引物对

Table 1. Pairs of the primers used in this study

Primers	Mutation sites	Oligonucleotide sequence (5'→3')*	$T_m/^\circ\text{C}$	Annealing temperature/ $^\circ\text{C}$
BF1F	Q34K	CGGCATCAAAGAGGACCTGCAACAG	65.3	60
BF1R		GTCCTCTTTGATGCCGTACCAATACTCGAG	66.1	
BF2F	Q39K	GGACCTGCAAAAAAACGGTGCAGCC	65.3	60
BF2R		CGCACCGTTTTTTTGCAGGTCCTCC	65.3	
BF3F	N40R	CTGCAACAGCGTGGTGCAGCCGTCT	68.5	63
BF3R		TCGCACCA CG CTGTTGCAGGTCCTC	68.5	
BF4F	T79E	GCGACGGGGGCGG AAA AGGTGAATC	68.5	62
BF4R		GCCGACGAGATTCACCTTT TC CGCC	66.9	
BF5F	A97K	GCTATGTTAAAGCCGTCGCGCCGATCTCG	70.2	60
BF5R		GACGGCTTTAACATAGCGCGACGAGAGGCC	70.2	
BF6F	A100K	CCGTCAAACCCGATCTCGTTGCGTC	66.9	62
BF6R		CGGGTTTGACGGCAGCAACATAGCG	66.9	
BF7F	D102E	GTCGCGCCCGAACTCGTTGCGTCGG	71.8	62
BF7R		CAACGAGTT TC GGGCGCGACGGCAGC	71.8	
BF8F	N125E	GCCGACTTCGTGCAGGAAGTGCTGG	68.5	63
BF8R		CGCCAGCACT TC CCTGCACGAAGTCG	68.5	
BF9F	N125D	AGGATGTGCTGGCGTACGATCCGAC	66.9	62
BF9R		ATCGTACGCCAGCACAT TC CCTGCACG	66.9	
BF10F	S135K	CGGGCTTCGTTTCATCGGTGATCGCC	68.5	63
BF10R		CCGATGAACGAAGCCCGGTCGGATC	68.5	
BF11F	A140R	GGTGATCCG T GCGTTCGTCAATGTG	65.3	60
BF11R		ACGAACGCACGGATCACCGATGAAG	65.3	
BF12F	N144K	GATCGCCCGGTTTCGTCAAAGTGTTT	65.3	62
BF12R		GATCCGAACACTTTGACGAACGCG	63.6	
BF13F	S152K	ACGAGCAAAGCCACAACACCAACC	63.6	58
BF13R		TTGTGGCTTTTGCTCGTCAGGATTC	62.0	
BF14F	T166K	CTGCAGAAACTGACCACCGCACGGG	68.5	63
BF14R		TGGTCAGTTTCTGCAGTGCGGCGAG	66.9	
BF15F	Y175D	CCGCCACGGATAACCAGAACTATCC	65.3	60
BF15R		ATAGTTCTGGTTATCCGTGGCGGCC	65.3	
BF16F	N178R	TACAACCAGCGTTATCCGAGCGCGG	66.9	62
BF16R		CGGATA AC CGCTGGTTGTACGTGGCG	66.9	
BF17F	V199K	GACCGAAACCAAAGGCGCAACACG	66.9	62
BF17R		GTGCGTGTTGCCGCTTTGGTTTCG	66.9	
BF18F	Q262E	CTCCGGAGAAAACGACGGGCTCGTG	68.5	63
BF18R		GTCGTTTTCTCCGGAGCCGCGGTTG	68.5	
BF19F	L278E	GTACGGCAAGGTGGAAAGCACGAGC	66.9	62
BF19R		TTGTAGCTCGTGCTTTCCACCTTGC	63.6	
BF20F	S281D	CAAGGTGCTGAGCACGGATTACAAG	63.6	58
BF20R		GGTTCCACTTGTAATCCGTGCTCAG	63.6	
BF21F	N285R	CTACAAGTGGCGTCACCTCGACGAG	66.9	62
BF21R		GAGGTGACGCCACTTGTAGCTCGTG	66.9	
BF22F	V305R	GTATGCTGAAGATCCGCGTGCGGTG	66.9	60
BF22R		ATCACCGCACGCGGATCTTCAGCAT	65.3	
BF23F	A306E	GATCCGGT CGA AGTGATCCGCACGC	68.5	62
BF23R		GCATGCGTGCGGATCACT TC GACCG	68.5	

*Bold nucleotides: the mutated sites.

拟、优化及评估,具体方法参照刘艳如等^[12]。(2) 利用 YASARA 软件^[13], 确定距离脂肪酶 LipA 活性中心氨基酸残基 Ser⁸⁷(组成活性中心催化三联体...Ser⁸⁷...His²⁸⁶...Asp²⁶⁴...的氨基酸残基之一) 9 Å 范围以内的所有氨基酸残基。(3) 在排除上述活性中心及其临近氨基酸残基的基础上, 利用 FoldX 软件和 Rosetta 软件对脂肪酶 LipA 其他位点的氨基酸残基进行虚拟饱和突变, 并计算出每个突变体的自由能变化值^[14-15]。(4) 以 $\Delta\Delta G < -0.5$ kcal/mol (FoldX 软件分析) 和 $\Delta\Delta G < 0$ kcal/mol (Rosetta 软件分析) 作为热稳定性提高的突变体的筛选标准, 合并上述 2 个突变电子文库。(5) 利用 YASARA 软件对上述突变电子文库中的每个突变体的三级结构进行分析, 删除结构明显不合理的突变体^[7];(6) 剩余的突变体, 进一步利用 YASARA 软件进行分析, 筛选出突变位点的氨基酸残基与周围氨基酸残基之间能形成盐桥的突变体, 作为本实验的研究对象。

1.3 脂肪酶 lipA 基因突变体的构建

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, 退火 30 s (退火温度参考表 1), 72 °C 6 min, 25 个循环; 72 °C 6 min。PCR 扩增产物经电泳鉴定后, 加入 0.5 μL QuickCut Dpn I 限制性内切酶(25 μL PCR 反应体系) 37 °C 酶切 4 h 后, 电泳、纯化目的产物, 并转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。重组转化子经培养后, 抽提质粒并送交测序公司进行序列分析。

1.4 脂肪酶 lipA 基因及其突变体的诱导表达

将测序验证正确的重组转化子转接到 5 mL LB 培养基(含 34 μg/mL 的氯霉素)中, 37 °C、

220 r/min 振荡培养 12 h。按 2% (V/V) 的接种率转接到 20 mL LB 培养基中(含 34 μg/mL 的氯霉素, 250 mL 三角瓶), 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 达 0.6-0.9 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。30 °C、220 r/min 培养 16 h 后, 离心收集菌体。用 pH 7.4 20 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 缓冲溶液洗涤菌体 1 次, 并重新用 8 mL 相同的缓冲溶液悬浮菌体。悬浮菌体利用超声破碎仪进行裂解, 裂解条件为: 处理时间 6 min, 功率 35%, 工作 2 s, 间歇 2 s。4 °C、12000 r/min, 离心 10 min, 收集上清液, 作为粗酶液, 进行后续分析。

1.5 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定采用比色法^[15]。具体酶学反应体系及测定方法参照刘艳如等^[12]。

1.6 热稳定性提高的脂肪酶突变体的筛选

脂肪酶热稳定性的测定方法参照刘艳如等^[12]。比较突变体脂肪酶与野生型脂肪酶在 55 °C 处理 12 min 后的残余酶活, 筛选出残余酶活大于野生型脂肪酶的突变体, 进行复筛。

1.7 脂肪酶及其突变体 T_{50}^{12} 和 $t_{1/2}$ 的测定

T_{50}^{12} 和 $t_{1/2}$ 的测定方法参照 Zhao 和 Arnold^[16]。具体实验方法、酶活测定体系等参照刘艳如等^[12]。

1.8 分子动力学模拟

利用 Gromacs 4.5.6 软件在 55 °C 条件下对野生型脂肪酶 LipA 和 3 个阳性突变体进行分子动力学模拟分析, 分析其 RMSD 变化趋势。分子动力学模拟使用的力场为 CHARMM27, 溶质原子距离盒子边缘的距离设置为 0.9 nm。同时, 向水溶剂中添加合适的抗衡离子(Na⁺/Cl⁻), 使模拟系统成电中性。系统能量优化采取最陡下降法(Steepest

descents)。经 NVT 平衡和 NPT 平衡后,在系统达到温度 328 K、压力 1.05 bar、密度 998.3 kg/m³ 时,对系统进行时长为 1 ns 的 MD 分析^[17]。

2 结果和分析

2.1 热稳定性增强且存在盐桥效应的 LipA 突变体电子文库的构建

利用 YASARA 软件,对模拟的 LipA 3D 结构进行分析,以距离 Ser⁸⁷ 9 Å 为标准,可将 Ser⁸⁷、His²⁸⁶、Asp²⁶⁴、Leu¹⁷ 和 Gln⁸⁸ (前 3 个氨基酸残基为组成催化三联体的氨基酸残基,后 2 个氨基酸残基为构成阴离子氧洞的氨基酸残基)等 40 个氨基酸残基排除在突变范围之外。以 $\Delta\Delta G < -0.5$ kcal/mol 为标准,利用 FoldX 构建的虚拟饱和突变文库含 511 个突变体;而以 $\Delta\Delta G < 0$ kcal/mol 为标准,利用 Rosetta 构建的虚拟饱和突变文库含 322 个突变体。合并上述 2 个突变体文库后,构建出 1 个覆盖率更高、包含 711 个突变体的电子文库。利用 YASARA 软件,逐一评估上述 711 个突变体的 3D 结构,删除空间结构冲突或空间结构不合理的突变体后,最终获得 1 个包含 341 个突变体的微型电子文库(表 2)。对上述 341 个突变体进一步分析,发现其中 27 个突变体存在盐桥效应(图 1)。

2.2 突变体的构建及突变效应

上述 27 个突变体中, LipA-Asn⁴⁰Arg 和 LipA-Asn⁴⁰Lys、LipA-Ala¹⁰⁰Arg 和 LipA-Ala¹⁰⁰Lys、LipA-Asn¹²⁵Asp 和 LipA-Asn¹²⁵Glu、LipA-Asn¹⁷⁸Arg 和 LipA-Asn¹⁷⁸Lys、LipA-Val¹⁹⁹Arg 和 LipA-Val¹⁹⁹Lys 为同一位点突变成性质相似的不同氨基酸残基。在第 1 轮筛选实验中,仅构建了突变体 LipA-Asn⁴⁰Arg、LipA-Ala¹⁰⁰Lys、LipA-Asn¹²⁵Asp、LipA-Asn¹⁷⁸Arg

和 LipA-Val¹⁹⁹Lys。上述突变体经验证后,若具有正效应,再构建对应的另外 1 个突变体(如 LipA-Asn¹²⁵Glu),因此实际仅对 23 个突变体进行了基因突变的工作(表 1)。最终经测序验证,成功获得 20 个突变体的重组蛋白。另外 3 个突变体(Tyr¹⁷⁵Asp、Asn¹⁷⁸Arg 和 Asn²⁸⁵Arg),多次实验结果均显示,虽然在突变位点发生了正确的基因突变,但同时在其他位置均存在插入突变。插入突变的引入与上述突变位置附近的核苷酸序列结构特点(如 GC 含量、回文序列等)有关。后续实验中,PCR 扩增体系及条件还有待进一步优化。不同突变体的突变效应如表 3。3 个突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp、LipA-Asn¹²⁵Glu 和 LipA-Gln²⁶²Glu 较野生型脂肪酶 LipA,热稳定性有显著性的提高。55 °C 处理 12 min 后,突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp、LipA-Gln²⁶²Glu 和 LipA-Asn¹²⁵Glu 的残余酶活较野生型 LipA 分别提高了 40.99%、52.3% 和 57.69%。

2.3 野生型脂肪酶及正效应脂肪酶突变体 T_{50}^{12} 的测定

野生型脂肪酶与正效应脂肪酶突变体的 T_{50}^{12} 测定结果如图 2。野生型脂肪酶 LipA 的 T_{50}^{12} 为 51 °C,3 个正效应的脂肪酶突变体较野生型脂肪酶的 T_{50}^{12} 均有一定程度的提高,分别为:55 °C (LipA-Asn¹²⁵Asp)、56.5 °C (LipA-Asn¹²⁵Glu)和 55.4 °C (LipA-Gln²⁶²Glu)。

2.4 野生型脂肪酶及正效应脂肪酶突变体 $t_{1/2}$ 的测定

野生型脂肪酶与正效应脂肪酶突变体的 $t_{1/2}$ 测定结果如图 3。野生型脂肪酶 LipA 的 $t_{1/2}$ 为 5.20 min,突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp 的 $t_{1/2}$ 为 11.6 min, LipA-Asn¹²⁵Glu 为 19.8 min, LipA-Gln²⁶²Glu 为 13.5 min。

表 2. 热稳定性脂肪酶 LipA 突变体电子文库及其对应的自由能变化值

Table 2. The thermostable lipase LipA mutant library designed by computer aid and the corresponding $\Delta\Delta G$ value of every mutant

Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)	Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)	Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)	Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)
G3R	-0.7785	A128S	-0.6913	A186T	-0.5100	V240D	-0.178
G3K	-0.5344	A128D	-0.4540	A186V	-0.5580	V240Q	-0.246
T7V	-0.8362	V129K	-0.5161	A186K	-0.6990	V240K	-0.321
R8K	-0.1200	A128K	-0.7085	T192L	-0.5124	L243T	-0.051
D21Q	-0.1930	Y129S	-0.8340	T192N	-0.5048	L243S	-0.240
D21E	-0.3920	V129L	-0.7060	T192H	-0.5344	T245K	-0.921
A24C	-0.5588	V129R	-0.9818	T192P	-1.4413	T245N	-0.147
A24E	-0.6514	V129E	-0.2590	A194L	-0.5913	L246R	-1.205
A24H	-0.8405	Y129A	-0.3040	A194R	-0.6576	A247L	-0.570
A24G	-1.3081	Y129T	-0.4570	A194K	-0.1120	A247R	-0.871
A24L	-1.3944	Y129N	-0.4930	A194N	-0.1400	A247D	-0.008
A24R	-2.7022	Y129Q	-0.5260	A194S	-0.2260	A247V	-0.115
A24N	-1.3826	L134R	-0.8425	A194Q	0.2890	A247E	-0.201
A24S	-0.0110	L134D	-0.5611	T198R	-0.8394	A247Q	-0.223
A24D	-0.1850	S135T	-0.5618	T198H	-0.5816	A247I	-0.399
A24K	-1.3030	S135Q	-0.6608	T198D	-1.0785	F249R	-0.517
A24Q	-0.5320	S135R	-1.8750	V199I	-0.9693	G250N	-0.450
L27I	-0.1160	S135K	-1.4986	V199H	-0.6688	G250A	-0.576
E28P	-2.1582	S136Q	-1.2996	V199L	-1.0340	G250K	-0.767
Q34R	-0.9208	S136P	-2.4084	V199R	-2.1772	G250I	-0.716
Q34K	-0.5994	S136R	-1.3254	V199K	-1.3822	G250T	-0.347
Q38R	-0.8354	S136K	-1.6446	H204K	-0.6588	G250E	-0.507
Q39R	-0.9360	S136E	-1.1263	H204I	-0.8610	M255L	-0.832
N40K	-0.0860	V138L	-0.9007	H204L	-1.2558	Q262E	-1.464
N40R	-0.3750	V138I	-0.5829	H204M	-0.5532	K269E	-1.712
T43R	-0.9446	S138K	-0.6372	L206F	-0.7061	K276D	-0.087
T43L	-1.1647	A140L	-0.9693	L206Y	-0.8394	L278E	-0.112
T43K	-1.1706	A140K	-0.5391	A210C	-0.5386	S279D	-0.533
T43E	-0.0350	A140D	-1.0960	A210L	-0.6448	S281E	-0.659
T43I	-0.3740	V143L	-0.5951	A210V	-0.5816	S281D	-0.109
V44I	-0.6242	V143I	-0.7605	A210T	-0.2900	S281N	-0.124
A47V	-0.9243	N144R	-0.7610	L218K	-1.0785	N285R	-3.381
A67K	-0.2760	V145L	-0.5312	L218N	-0.0050	N285K	-1.936
A67R	-0.6817	V145I	-0.5654	L218S	-0.1150	L294K	-0.645
A67N	-0.0150	V145R	-0.5241	L218T	-0.1760	L294R	-0.517
A67E	-0.0820	T150R	-0.6940	S219E	-0.4060	L294N	-0.378
K70L	-0.6738	T150C	-0.7912	S219T	-0.3770	V296L	-0.715
T71A	-0.5249	T150K	-0.9236	S219Q	-0.9693	V296I	-0.655
T71L	-0.9591	S152K	-0.6748	V220I	-2.1772	V296K	-0.967
T71K	-0.9708	S153T	-0.4030	V220T	-0.7750	A299L	-0.927
T71E	-0.6674	S153R	-0.6373	F221D	-1.3700	A299V	-0.622
T71Q	-0.8760	S153K	-0.5605	T224V	-1.0490	A299I	-0.736

(待续)

(续表 2)

T71I	-1.0157	S153E	-0.6592	T224I	-1.328	A299R	-0.734
T71R	-1.1490	S153Q	-0.6412	T224R	-1.308	A299C	-0.893
T71D	-0.0460	S153D	-0.6851	T224K	-1.789	A299Q	-0.599
V72I	-1.0980	S153N	-0.0520	G225A	-0.571	A299T	-0.047
A74N	-0.0620	S153V	-0.2740	G225L	-0.745	A299K	-1.059
A75Q	-0.0850	N155D	-0.5002	G225K	-0.772	E302P	-0.971
A75I	-0.1030	T156G	-0.7054	G225D	-0.876	E302Q	-0.238
A75K	-0.1090	T156A	-0.7947	G225R	-1.012	V305R	-0.586
A75L	-0.3200	T156R	-0.9517	T227K	-0.563	V305Q	-0.038
A75E	-0.5730	T156S	-0.6136	D228K	-1.126	A306L	-0.555
A78R	-0.9365	T156C	-0.8422	T229S	-0.558	A306S	-0.651
A78S	-0.6248	T156D	-0.7406	T229E	-0.919	A306Q	-0.504
A78K	-0.9667	T156N	-0.8129	T229Q	-0.875	A306E	-0.067
T79P	-0.9351	T156L	-1.0726	T229R	-2.095	A306K	-0.157
T79R	-0.9866	T156P	-1.0719	T229K	-1.584	I308M	-0.642
T79E	-0.7094	T156K	-1.2328	T231Q	-0.783	T310E	-1.226
T79K	-1.0755	T156E	-1.0154	T231R	-1.979	T310I	-1.043
K80R	-0.8256	T156Q	-1.0131	L232Q	-0.171	T310R	-0.556
A97R	-0.8281	N157D	-0.7379	L232E	-0.296	T310K	-0.843
A97K	-1.5113	L161E	-0.5420	L232K	-0.458	T310Q	-0.888
A98I	-0.6848	Q165K	-0.5024	L234A	-0.895	T310N	-0.636
A98L	-1.6157	T166Q	-1.7472	L234G	-1.366	T310S	-0.331
A98R	-2.2462	T166N	-1.5465	L234R	-1.456	A312L	-0.534
A98K	-1.4528	A170Q	-0.5121	L234D	-1.209	A312M	-3.206
A100L	-1.4349	A170D	-0.5624	L234N	-0.214	N313A	-0.632
A100R	-1.3800	A170E	-0.0770	L234D	-0.220	N313K	-0.903
A100K	-1.4495	A170T	-0.0830	L234K	-0.012	N313Q	-0.656
D102R	-0.7704	A173E	-0.7490	L234K	-0.309	N313H	-0.544
D102E	-0.6733	T174R	-0.9199	V235G	-0.045	N313L	-1.870
D102Q	-0.7028	T174N	-0.0700	V235A	-0.169	N313R	-0.136
D102N	-0.5314	Q177N	-0.0650	V235E	-0.304	R314I	-0.043
V104I	-0.7344	Q177K	-0.3540	V235T	-0.431	R314N	-0.249
S117M	-1.3885	N178Q	-0.9495	V235S	-0.523	R314E	-0.322
N125K	-0.0370	N178L	-1.0417	V235D	-0.563	R314A	-0.358
N125T	-0.1110	N178R	-1.0936	V235N	-0.631	R314Q	-0.389
N125L	-0.1610	N178K	-1.1880	V235L	-0.811	R314K	-0.422
N125D	-0.1960	P180R	-0.8366	V235I	-0.575	R314K	-0.518
N125I	-0.2750	A186E	-0.6911	V235R	-0.793	K316R	-0.543
N125Q	-0.7590	A186S	-0.0020	V235K	-0.773	L317R	-0.949
N125E	-1.3540	A186D	-0.1090	V235Q	-0.786	L317K	-0.564
V126L	-0.7786	A186L	-0.0510	N239R	-1.611	L317N	-0.077
V126I	-0.8724	A186C	-0.2560	N239K	-2.227		
A128N	-0.6060	A186H	-0.2580	V240E	-0.170		
A128L	-0.5365	A186I	-0.2640	V240N	-0.141		

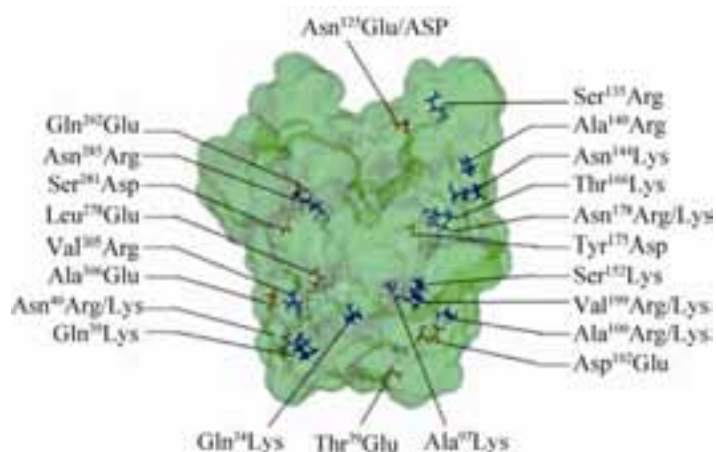


图 1. 在 LipA 突变体电子文库中存在盐桥效应的突变体

Figure 1. The corresponding mutation sites to form salt bridge in the LipA molecular model.

表 3. 经热处理后, 脂肪酶突变体与野生型脂肪酶残余酶活的比较

Table 3. The difference comparison of the residual activity between LipA mutants and the wild-type LipA

LipA mutants	Increase rate of residual activity/%	LipA mutants	Increase rate of residual activity/%
LipA-Gln ³⁴ Lys	3.52±1.14	LipA-Ala ¹⁴⁰ Arg	1.25±0.51
LipA-Gln ³⁹ Lys	-8.899±0.600	LipA-Asn ¹⁴⁴ Lys	-1.070±1.067
LipA-Asn ⁴⁰ Arg	2.56±0.65	LipA-Ser ¹⁵² Lys	-8.35±2.15
LipA-Thr ⁷⁹ Glu	-1.55±1.22	LipA-Thr ¹⁶⁶ Lys	-9.12±1.56
LipA-Ala ⁹⁷ Lys	-7.83±1.25	LipA-Val ¹⁹⁹ Lys	-9.60±0.26
LipA-Ala ¹⁰⁰ Lys	-4.23±0.26	LipA-Gln ²⁶² Glu	52.30±2.13
LipA-Asp ¹⁰² Glu	-6.92±1.53	LipA-Leu ²⁷⁸ Glu	0.85±1.53
LipA-Asn ¹²⁵ Glu	57.69±1.43	LipA-Ser ²⁸¹ Asp	-9.80±0.23
LipA-Asn ¹²⁵ Asp	40.99±1.14	LipA-Val ³⁰⁵ Arg	-1.210±1.413
LipA-Ser ¹³⁵ Lys	-6.39±1.75	LipA-Ala ³⁰⁶ Glu	-7.63±2.56

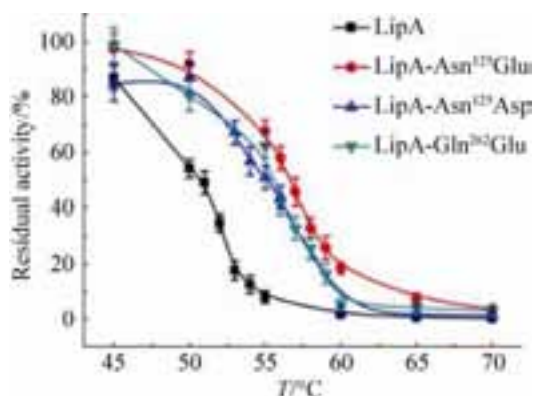


图 2. 野生型脂肪酶及其突变体 T_{50}^{12} 的测定

Figure 2. The difference in T_{50}^{12} value between the wild-type LipA and LipA mutants. The T_{50}^{12} value at each temperature was the average value of the three independent assays and the errors of each T_{50}^{12} value were presented as the standard deviation.

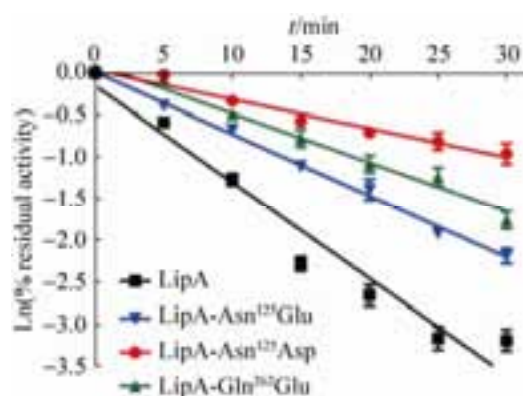


图 3. 野生型脂肪酶及其突变体 $t_{1/2}$ 的测定

Figure 3. The difference of the $t_{1/2}$ graph between the wild-type LipA and LipA mutants. The residual activity at each temperature was the average value of the three independent assays and the errors of each $\ln(\% \text{ residual activity})$ value were presented as the standard deviation.

2.5 脂肪酶突变体稳定性提高的分子机制分析

3 个正效应脂肪酶突变体在突变位点与周围临近的氨基酸残基之间形成盐桥结构示意图(图 4-A-C)。突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp(图 4-A)和突变体 LipA-Asn¹²⁵Glu(图 4-B)的 Asp¹²⁵、Glu¹²⁵ 分别与 Arg²⁵⁸ 氨基酸残基之间形成了盐桥。突变体

LipA-Gln²⁶²Glu 的 Glu²⁶² 与 Lys²⁶⁹ 氨基酸残基之间形成了盐桥(图 4-C)。图 4-D 显示, 3 个脂肪酶突变体的 RMSD 值的波动范围较野生型脂肪酶都有一定的降低, 其中 LipA-Asn¹²⁵Glu 的 RMSD 值下降最为明显, 分子动力学模拟的结果与前述实验结果基本一致。

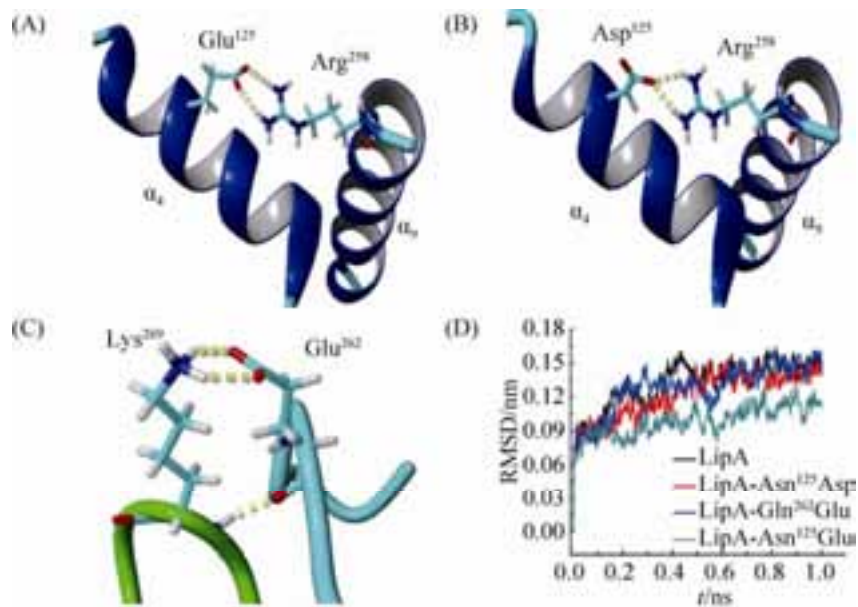


图 4. 脂肪酶突变体热稳定性提高的分子机制

Figure 4. Molecular mechanism for thermostability improvement of three lipase mutants. The schematic model of the salt bridge position in the 3D structural model of LipA mutants was shown in the (A), (B) and (C), respectively. D displayed the overall RMSD values of wild-type LipA and LipA mutants.

3 讨论

热耐受性生物催化剂较中温催化剂而言, 可以在较高温度下催化反应, 提高催化效率; 降低产物被污染的概率; 同时, 酶制剂具有较好的稳定性, 可以提高重复使用批次, 从而有效降低生产成本。近些年来, 围绕热稳定催化剂资源的挖掘^[18]、热稳定蛋白耐热的分子机制^[3,19]、热稳定催化剂突变体的构建^[20]及热稳定蛋白突变体的高通量筛选^[21]等方面的研究, 取得了长足的进展, 诞生了一系列新技术新方法。

同定向进化技术中构建突变基因文库一样, 电子突变文库的质量直接决定了阳性突变率的高低。Floor 等仅从 150 个突变体的电子文库中筛选到半衰期延长了 200 多倍的阳性突变体^[7]; Wijma 等从包含 64 个突变体的电子文库中, 筛选到 21 个热稳定突变体。其中最热稳定性突变体, 表观熔点温度从 50 °C 提高到 85 °C, 半衰期提高了 250 多倍^[15]。本实验中, 虽未对产生的 341 个突变体的电子文库全部进行实验验证, 但验证存在盐桥效应的 27 个突变体的实验结果表明, 仅 3 个脂肪酶突变体的热稳定性有显著性提高, 阳性突

变率依然较低。较低的阳性突变率与突变氨基酸的选定范围、筛选突变体自由能 $\Delta\Delta G$ 的划分标准存在一定的联系。本试验中, 我们以 9 Å 作为活性中心范围的标准。事实上, LipA 分子的 3D 结构具有较深的 funnel-like 状底物结合部位^[22], 其活性中心的范围远大于 9 Å (如位于活性中心的 Ser⁸⁷ 的 C_α 原子与 Leu¹²⁷ 的 C_α 原子之间的距离为 22.178 Å)。因此, 通过扩大活性中心范围的氨基酸残基(本试验中, 活性中心的氨基酸残基排除在潜在突变位点之外), 可以有效降低突变体文库的容量, 一定程度上有助于提高阳性突变率。另外, 精确计算突变体自由能, 并划定出合理的数值区间, 作为筛选、评估突变体的突变效应的标准, 也有助于提高阳性突变率。Morloy 和 Kazlauskas 统计了目前报道的各类阳性突变体的 $\Delta\Delta G$ 自由能变化, 发现 $-\Delta\Delta G$ 值在高于 2–3 kcal/mol 时, 具有良好的阳性突变效应^[23]。Christensen 和 Kepp 通过优化 FoldX 程序并精准计算出 $\Delta\Delta G$ 的数值, 有效提高了预测及评估潜在突变位点的能力^[14]。

突变体 LipA-Gln²⁶²Glu 在—Glu²⁶².....Lys²⁶⁹—之间形成盐桥, Glu²⁶² 和 Lys²⁶⁹ 均位于 loop 环上。通过提高蛋白质柔性区域(flexible region)的刚性(rigidity), 实现增强蛋白质的稳定性, 已成为构建热稳定蛋白质的常规策略^[20,24–25]。突变体 LipA-Asn¹²⁵Asp 和 LipA-Asn¹²⁵Glu 形成的盐桥位于 LipA 分子的 α -螺旋 α^4 与 α^9 之间, 而 α^4 和 α^9 是构成 LipA 分子 2 个盖子结构域(Lid1/Lid2)的重要二级结构成分(Lid1 由 α^4 和 α^5 及其两侧的 loop 区组成; Lid2 由 α^8 、 α^9 、 β_3 和 β_4 及其临近的 loop 区组成)。脂肪酶的盖子结构域具有高度的柔性和灵活性, 在油水界面, 盖子结构由闭合状态转变为打开状态, 暴露出脂肪酶分子的活性中心, 完成脂肪酶的界面激活(Interfacial activation)功能^[26–27]。

本实验仅测定了突变体电子文库中存在盐桥效应突变体的突变效应, 初步实验结果证实利用生物信息学构建的突变体电子文库具备筛选热稳定性突变体的潜力和价值。进一步深入分析该电子文库中各类突变体提高热稳定性的分子机制, 可发现存在多种效应, 如二硫键效应(如 Ala²⁴Cys/Thr¹⁵⁰Cys 间可形成二硫键)、脯氨酸效应(如 Ser¹³⁶Pro、Thr¹⁵⁶Pro 等)、疏水效应、 β -转角构象优化等。初步试验结果表明: 不同效应叠加产生的突变体, 具备更好的热稳定性。如本实验筛选出的具有盐桥效应的突变体继续叠加脯氨酸效应突变产生的叠加突变体, 其 T_{50}^{12} 较野生型 LipA 提高了 10.2 °C; $t_{1/2}$ 延长了 18 倍, 更详细深入的调查仍在进行之中。

参考文献

- [1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235–251.
- [2] Pleiss J, Fischer M, Peiker M, Thiele C, Schmid RD. Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymes*, 2000, 10(5): 491–508.
- [3] Vieille C, Zeikus GJ. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 2001, 65(1): 1–43.
- [4] Royter M, Schmidt M, Elend C, Höbenreich H, Schäfer T, Bornscheuer UT, Antranikian G. Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter Thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis*. *Extremophiles*, 2009, 13(5): 769–783.
- [5] Reetz MT, Carballeira JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 891–903.
- [6] Reetz MT, Kahakeaw D, Lohmer R. Addressing the numbers problem in directed evolution. *ChemBiochem*, 2008, 9(11): 1797–1804.

- [7] Floor RJ, Wijma HJ, Colpa DI, Ramos-Silva A, Jekel PA, Szymański W, Feringa BL, Marrink SJ, Janssen DB. Computational library design for increasing Haloalkane dehalogenase stability. *ChemBioChem*, 2014, 15(11): 1660–1672.
- [8] Zhou XL, Gao L, Yang GY, Liu DL, Bai AX, Li BC, Deng ZX, Feng Y. Design of hyperthermophilic lipase chimeras by key motif-directed recombination. *ChemBioChem*, 2015, 16(3): 455–462.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Shu ZY, Lin H, Shi SL, Mu XD, Liu YR, Huang JZ. Cell-bound lipases from *Burkholderia* sp. ZYB002: gene sequence analysis, expression, enzymatic characterization, and 3D structural model. *BMC Biotechnology*, 2016, 16(1): 38.
- [12] Liu YR, Qiu LQ, Huang JZ, Zhao BC, Wang ZZ, Zhu XL, Gao YY, Shu ZY. Screening for mutants with thermostable lipase A from *Burkholderia* sp. ZYB002. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(6): 748–754. (in Chinese)
刘艳如, 邱黎清, 黄建忠, 赵丙春, 王作镇, 朱晓兰, 高媛媛, 舒正玉. 热稳定性伯克霍尔德菌脂肪酶 A 突变体的筛选. *微生物学报*, 2015, 55(6): 748–754.
- [13] 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.
- [14] Christensen NJ, Kepp KP. Accurate stabilities of laccase mutants predicted with a modified FoldX protocol. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2012, 52(11): 3028–3042.
- [15] Wijma HJ, Floor RJ, Jekel PA, Baker D, Marrink SJ, Janssen DB. Computationally designed libraries for rapid enzyme stabilization. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2014, 27(2): 49–58.
- [16] 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.
- [17] Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 2013, 29(7): 845–854.
- [18] Liszka MJ, Clark ME, Schneider E, Clark DS. Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2012, 3(1): 77–102.
- [19] Li WF, Zhou XX, Lu P. Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances*, 2005, 23(4): 271–281.
- [20] Yu HR, Huang H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(2): 308–315.
- [21] Bommarius AS, Broering JM, Chaparro-Riggers JF, Polizzi KM. High-throughput screening for enhanced protein stability. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17(6): 606–610.
- [22] Kim KK, Song HK, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, 1997, 5(2): 173–185.
- [23] Morley KL, Kazlauskas RJ. Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(5): 231–237.
- [24] Mamonova TB, Glyakina AV, Galzitskaya OV, Kurnikova MG. Stability and rigidity/flexibility—two sides of the same coin? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2013, 1834(5): 854–866.
- [25] Rathi PC, Fulton A, Jaeger KE, Gohlke H. Application of rigidity theory to the thermostabilization of lipase A from *Bacillus subtilis*. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(3): e1004754.
- [26] Cheng M, Angkawidjaja C, Koga Y, Kanaya S. Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I. 3 lipase with unique two lid structures. *The FEBS Journal*, 2012, 279(19): 3727–3737.
- [27] 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.

Computer-aid screening of thermostable lipase LipA from *Burkholderia* sp. ZYB002

Yanru Liu^{*}, Bingchun Zhao, Panpan Dong, Liqing Qiu, Jianzhong Huang, Xiaolan Zhu, Zuozen Wang, Zhengyu Shu^{*}

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 lipase LipA from *Burkholderia cecapica* ZYB002 using protein engineering technology. [Methods] Lipase LipA mutant library was designed and screened using the following software, YASARA, FoldX, Rosetta, and Gromacs. We screened 27 thermostable lipase LipA mutants displaying the salt bridge effect among the resulting library of 341 variants, and then further screened using the site-directed mutagenesis technology. [Results] Three mutants LipA-Asn¹²⁵Asp, LipA-Asn¹²⁵Glu and LipA-Gln²⁶²Glu displayed improved thermostability. The T_{50}^{12} value of LipA-Asn¹²⁵Asp, LipA-Asn¹²⁵Glu and LipA-Gln²⁶²Glu increased by 4.0 °C, 5.5 °C and 4.4 °C, respectively. The half-life of LipA-Asn¹²⁵Asp, LipA-Asn¹²⁵Glu and LipA-Gln²⁶²Glu at 55 °C increased by 2.23-fold, 3.8-fold and 2.6-fold, respectively. [Conclusion] It is feasible to screen thermostable mutant from the computationally designed library.

Keywords: *Burkholderia* sp. ZYB002, lipase LipA, *in silico* design and screening, salt bridge, thermostable mutant

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370802, 30870545), by the Key Project from Science and Technology Bureau of Fujian Province (2013H0021) and by the Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholar of Fujian Province (2009J06013)

^{*}Corresponding authors. 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: 1 October 2016; Revised: 11 November 2016; Published online: 2 December 2016