



基于空腔填充效应构建伯克霍尔德菌脂肪酶 LipA 的热稳定性突变体

刘艳如^{*}, 李鑫, 董盼盼, 黄建忠, 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】中温伯克霍尔德菌胞外脂肪酶 LipA 在工业领域具有重要的应用价值。利用蛋白质工程技术来提高其热稳定性, 对开发脂肪酶 LipA 酶制剂及提高其应用范围及应用效果, 具有重要的意义。【方法】利用生物信息学软件 Castp、Voroia 和 Cave 分析 LipA 分子中存在的空腔及其组成氨基酸残基; 利用 FoldX 软件构建上述氨基酸残基的突变体电子文库, 并基于空腔效应(体积变小)、自由能变化值(降低)和空间结构特点等对前述突变体电子文库进行筛选。从突变体电子文库中选择具有代表性的突变体, 通过基因工程技术, 引入突变。经诱导表达后, 实验验证并筛选出热稳定性的突变体。【结果】构建了一个由 58 个突变体组成的电子文库; 并对其中 17 个代表性的突变体进行了实验验证; 筛选到 2 个热稳定性有明显提高的突变体 LipA-His¹⁵Pro 和 LipA-Ala²¹⁰Val; 其叠加突变体 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 的 T_{50}^{12} 较野生型 LipA 提高了 8 °C, 在 55 °C 下的半衰期较野生型脂肪酶 LipA 提高了 23.1 倍。【结论】基于空腔填充技术构建热稳定性伯克霍尔德菌胞外脂肪酶 LipA 突变体, 是一种行之有效的策略。

关键词: 伯克霍尔德菌, 脂肪酶 LipA, 空腔填充效应, T_{50}^{12} , 半衰期

脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)又称为三酰甘油酯水解酶, 具有独特的油水界面激活的催化特性。脂肪酶除了可以催化酯的水解反应外, 还可以催化酯的合成、转酯化、酯交换、醇解和氨解等反应类型^[1]。微生物脂肪酶催化的各类反应, 具有高

效的专一性, 严谨的对映体选择性、位点选择性或链长选择性等优点, 已被广泛应用于食品加工、手性化合物合成、洗涤剂、造纸、废水处理及生物柴油酶法合成等领域^[2]。天然微生物脂肪酶欠佳的热稳定性, 一定程度上限制了其在工业领域的

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370802, 31870787); 福建省科技厅重点项目(2013H0021); 福建省自然科学基金项目(2017J01441)

^{*}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: 2018-10-08; 修回日期: 2019-01-25; 网络出版日期: 2019-02-27

规模化应用。为了克服这一障碍,化学修饰技术、固定化技术和蛋白质工程改造技术等均被应用于酶蛋白热稳定性的改良^[3]。近年来,随着生物信息学、计算化学和结构生物学的快速发展,蛋白质工程改造技术正被越来越多的研究人员应用于酶蛋白的分子改良,并取得显著效果。

利用蛋白质工程技术改良酶蛋白的热稳定性主要有两种策略:理性设计(或半理性设计)和定向进化。过去20年中,利用定向进化策略已成功改良各种酶蛋白,获得了系列优良的热稳定性酶蛋白突变体^[4]。但定向进化技术依赖庞大突变文库进行高通量筛选,方可获得理想突变体,或需要耗费大量的人力物力资源,或依赖酶标仪等高端设备及高通量筛选技术。近年来,随着越来越多的蛋白质3D结构被解析,结合越来越成熟的生物信息学的手段,基于理性设计(或半理性设计)策略,构建小型smart突变文库,快速获得理想的热稳定性突变体蛋白质分子,获得了突破性的进展。如Floor等以*Sphingomonas paucimobilis* 卤代烷脱盐酶(haloalkane dehalogenase) LinB为研究对象,从150个突变体的小型文库中筛选到半衰期延长了200多倍的阳性突变体^[5];Wijma等以*Rhodococcus erythropolis* 柠檬烯-1,2-环氧化物水解酶(limonene-1,2-epoxide hydrolase)为研究对象,从包含64个突变体的小型文库中,筛选到21个热稳定提高的突变体。其中最优热稳定性突变体,表观熔点温度(apparent melting temperature)从50 °C提高到85 °C,半衰期提高了250多倍^[6]。

蛋白质分子的空腔(cavity)是由于组成蛋白质的氨基酸在天然状态下包装(packaging)不够致密而在蛋白分子表面或内部形成的空洞^[7-8]。不同位置的空腔对蛋白质的性质和功能的影响不同,如:蛋白质结构域与结构域之间的空腔,对于结构域

之间的相对运动和构象变化具有重要的功能;而蛋白质内部的空腔,可能影响到蛋白质的稳定性和催化活性^[9-10]。对蛋白质分子的空腔进行改造,可显著提高其温度稳定性。如对*Bacillus circulans* 木聚糖酶(xylanase)分子表面的空腔进行理性设计,获得的突变体热稳定性($t_{1/2}$)提高了15倍^[11];而对*Bacillus stearothermophilus* 普鲁兰酶(neopullulanase)分子内的空腔进行理性设计,获得的突变体热稳定性($t_{1/2}$)提高了13倍^[12]。

本课题组制备的中温*Burkholderia* sp. ZYB002 脂肪酶LipA在造纸等领域具有潜在的应用价值^[13-14]。为进一步提高其应用效果,本课题组基于B-factor筛选突变位点^[15]和理性设计盐桥等策略^[16],显著提高了*Burkholderia* sp.脂肪酶LipA的热稳定性,突变体LipA-Phe²²¹Asp/Asn¹²⁵Glu的 T_{50}^{12} 较野生型LipA提高了11.1 °C, $t_{1/2}$ 延长了49.6倍。本论文报道了基于空腔填充效应,通过理性设计策略,成功改良脂肪酶LipA分子的热稳定性实验结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与载体:*Burkholderia* sp. ZYB002 菌株胞外脂肪酶LipA及其伴侣蛋白LipB的编码基因均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均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、Quick Dpn I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和PCR Clean-Up System等试剂盒

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*-nitripheny 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); 其他试剂均为分析纯。本实验使用的寡核苷酸引物对由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体序列如表 1。

表 1. 本实验所用的 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	LipA-H ¹⁵ P	ATCATCCTCGTTCCGGGGCTCTCG	65.8	62
BF1R		GGTACCCGAGAGCCCCGGAACGAG	69.0	
BF2F	LipA-D ²¹ M	GGCTCTCGGGTACCATGAAGTACG	61.9	56
BF2R		GCCCCGCTACTTCATGGTACC	61.5	
BF3F	LipA-D ²¹ V	GGGCTCTCGGGTACCGTTAAGTAC	61.7	55
BF3R		CGCGTACTTAACGGTACCCGAG	60.4	
BF4F	LipA-D ²¹ R	GGGCTCTCGGGTACCCGTAAGTAC	63.8	58
BF4R		CCCGTACTTACGGGTACCCG	63.4	
BF5F	LipA-D ³⁶ I	ACGGCATCCAGGAGATTCTGCAAC	62.1	56
BF5R		CCGTCTGTGTCAGAATCTCCTGG	60.5	
BF6F	LipA-E ⁶³ Y	CGCGGCTATCAGTTGCTCGCTTAC	63.2	58
BF6R		AACTGATAGCCGCGCCCGTTC	63.6	
BF7F	LipA-N ⁸² L	GGCGACCAAGGTGCTGCTCGTC	66.8	62
BF7R		GTGGCCGACGAGCAGCACCTTG	67.0	
BF8F	LipA-V ⁸⁴ I	GACCAAGGTGAATCTCATTGGCCAC	62.2	57
BF8R		CCTGGCTGTGGCCAATGAGATTC	63.0	
BF9F	LipA-A ²¹⁰ V	CCTGCTGTATTCTGGGTTGGCAC	63.4	58
BF9R		ATCGCCGTGCCAACCCACGAATAC	64.9	
BF10F	LipA-A ²¹⁰ I	CCTGCTGTATTCTGGGTTGGCAC	61.0	56
BF10R		ATCGCCGTGCCAACCCACGAATAC	62.4	
BE11F	LipA-A ²¹⁰ L	CCTGCTGTATTCTGGGTTGGCAC	65.8	60
BF11R		ATCGCCGTGCCAACCCACGAATAC	67.2	
BF12F	LipA-A ²¹⁰ C	CCTGCTGTATTCTGGGTTGGCAC	63.4	58
BF12R		ATCGCCGTGCCAACCCACGAATAC	64.8	
BF13F	LipA-A ²¹⁰ M	CCTGCTGTATTCTGGGTTGGCAC	63.1	58
BF13R		ATCGCCGTGCCAACCCACGAATAC	64.5	
BF14F	LipA-T ²⁸⁰ L	AAGGTGCTGAGCCTGAGCTACAAG	61.6	56
BF14R		TTCCACTTGTAGCTCAGGCTCAGC	61.6	
BF15F	LipA-N ²⁸⁵ V	ACGAGCTACAAGTGGGTTACCTC	61.3	55
BF15R		TCGTCGAGGTGAACCCACTTGTAG	60.9	
BF16F	LipA-E ²⁸⁹ V	ACCACCTCGACGTTATCAACCAGC	61.7	55
BF16R		GAGCAGCTGGTTGATAACGTCGAG	60.3	
BF17F	LipA-V ²⁹⁶ L	CAACCAGCTGCTCGGCCTGCGCGG	73.6	63
BF17R		ATACGCGCCGCGCAGCCGAGCAG	74.6	

1.2 热稳定性脂肪酶 LipA 突变体电子文库的构建及筛选

利用生物信息学构建热稳定性脂肪酶 LipA 突变体电子文库的基本步骤如下：(1) 使用 Castp^[17]、Voronoi^[18]和 Cave^[19]软件预测出 LipA 3D 分子结构中存在的空腔数量及其对应的氨基酸残基组成；(2) 分析并筛选出上述 3 个软件预测结果中，脂肪酶 LipA 的空腔及其氨基酸残基组成的交集；并利用 FoldX^[20]构建上述氨基酸残基的突变体电子文库；(3) 筛选出电子文库中自由能变化小于 -0.5 kcal/mol 的突变体；并进一步利用 Castp 筛选出突变后空腔体积变小的突变体，最终获得的结构合理的突变体构成突变电子文库^[5,21]；(4) 从上述预测的各个空腔中，选择有代表性的突变体，利用基因工程技术引入突变；经诱导表达后，测定每个突变体的突变效应，进而评估空腔效应；(5) 进一步构建并筛选阳性突变体所在空腔的其他突变体。

1.3 脂肪酶 lipA 突变文库的构建

利用表 1 的引物对，以质粒 pACYC-lipA/lipB 为模板，通过滚环 PCR 扩增引入突变。PCR 扩增程序为：95 °C 5 min；95 °C，30 s；不同引物对的退火温度参考表 1，退火时间 30 s；72 °C 延伸 6 min；25 个循环；72 °C 延伸 7 min。利用 Dpn I 内切酶 37 °C 下酶切 PCR 扩增产物 6 h。酶切产物经纯化回收后热击转化 *E. coli* BL21(DE3)。突变基因经测序验证。

1.4 脂肪酶 lipA 及其突变体基因的诱导表达及粗酶液的制备

脂肪酶 LipA 及突变体 LipA 粗酶液的制备参照刘艳如等(2017)^[16]。测序正确的转化子利用 LB 液体培养基培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.9 后，加入终

浓度为 1 mmol/L 的 IPTG，30 °C 诱导培养 16 h。离心收集菌体，经超声裂解后，再次离心收集裂解上清液作为粗酶液。

1.5 蛋白浓度测定

采用 Bradford 法测定野生型 LipA 与突变体 LipA 粗酶液的蛋白浓度^[22]。

1.6 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定采用比色法^[23]。酶学反应体系如下：20 mmol/L pH 7.4 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲体系，终浓度为 0.33 mmol/L 的 4-硝基苯月桂酸酯，加入合适稀释度的脂肪酶酶液 30 μL ，40 °C 反应 5 min。记录 410 nm 下反应体系吸光度的变化值(在上述反应条件下， $\epsilon_{410\text{nm}}$ 为 0.0131 L/($\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$)。在上述的条件下，每分钟释放 1 μmol 对硝基苯酚所需要的酶量定义为一个酶活单位(U)。

1.7 热稳定性提高的脂肪酶突变体的初筛

脂肪酶热稳定性的测定参照刘艳如^[16]等。调整野生型脂肪酶 LipA 和突变体脂肪酶 LipA 粗酶液到相同的蛋白质浓度；55 °C 水浴 12 min 后迅速置于冰上冷却。室温下静置 30 min 后，分别测定野生型脂肪酶 LipA 及突变体脂肪酶 LipA 的残余酶活。筛选出残余酶活较野生型脂肪酶 LipA 有提高的突变体脂肪酶 LipA。

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

T_{50}^{12} 和 $t_{1/2}$ 测定参考 Zhao 和 Arnold^[24]。

T_{50}^{12} 的测定：将脂肪酶 LipA(或突变体)置于 45–70 °C 热处理 12 min，迅速水浴降至室温。依次测定脂肪酶最适反应条件下的酶活，计算出残余酶活为未处理时酶活的 50%时所对应的温度。

$t_{1/2}$ 的测定：在 pH 7.4 的条件下，将脂肪酶于

55 °C 水浴处理, 不同处理时间分别测定脂肪酶残余酶活。当脂肪酶残余酶活降至未处理脂肪酶酶活 50% 时对应的处理时间即为脂肪酶的半衰期。

1.9 分子动力学模拟

利用 Gromacs 5.1.4 软件对脂肪酶 LipA 及突变体 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 在 55 °C 下进行分子动力学模拟, 分析其 RMSD 值的变化趋势。LipA 及突变体 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 催化三联体的 His 均质子化处理。在 CHARMM27 力场下, 向含平衡 TIP3P 水分子的六面体盒子内, 添加 Na⁺平衡体系的电荷, 以达到电中性。体系与盒子边的最小距离为 0.9 nm。采用最陡下降法(steepest descents)对系统进行能量最小化, 用 NVT 和 NPT 对系统进行平衡, 使其系统温度为 328 K, 压力为 1.05 bar。在此条件下进行时长为 40 ns 的分子动力学模拟。

2 结果和分析

2.1 脂肪酶 LipA 3D 结构中存在的空腔及组成空腔的氨基酸残基分析

利用 Castp、Voronoi 和 Cave 软件预测脂肪酶 LipA 的三维结构中存在的空腔数目分别为 35 个、20 个和 24 个。3 个软件均预测出的空腔(共 12 个)及其氨基酸残基组成如表 2。从表 2 中可以看出, 不同软件预测出的每个空腔的氨基酸残基的组成存在一定的差异。

2.2 脂肪酶 LipA 突变体电子文库的构建

对上述 3 个软件均预测为组成空洞的氨基酸残基, 利用 FoldX 软件, 构建并筛选上述氨基酸残基的突变体电子文库(筛选标准: $\Delta\Delta G < -0.5$ kcal/mol

作为热稳定性提高的阳性突变体), 共获得 68 个阳性突变体; 对前述 68 个突变体的空腔效应利用 Castp 评估后, 剔除 10 个空腔体积增大的突变体, 最终获得 58 个符合预期目标的突变体, 组成脂肪酶 LipA 的突变体电子文库(表 3)。

2.3 脂肪酶 lipA 基因微型突变文库的构建

上述 58 个突变体分属 11 个空腔(表 2 的 1 号空腔中未能筛选到符合要求的电子突变体)。从每个空腔中选择一个具有代表性的突变体(选择的突变位点及对应的突变氨基酸残基见表 4), 利用定点突变技术, 构建突变基因, 引入突变氨基酸残基。由于 3 号空腔中选择的突变体 LipA-Asp²²⁸Leu 未能构建成功, 因此实际只构建 10 个 lipA 突变基因, 并考察对应的 10 个空腔的突变效应。经诱导表达、脂肪酶 LipA 突变体的热稳定性分析后, 仅 LipA-His¹⁵Pro 和 LipA-Ala²¹⁰Val 表现为阳性效应(分别属于第 5 个空腔和第 6 个空腔, 如表 2)。在此基础上, 进一步构建表 3 中属于第 5 个空腔(LipA-Asp²¹Val、LipA-Asp²¹Met 和 LipA-Asp²¹Arg) 和第 6 个空腔的突变体(LipA-Ala²¹⁰Ile、LipA-Ala²¹⁰Leu、LipA-Ala²¹⁰Cys 和 LipA-Ala²¹⁰Met)。各个突变体的突变效应如表 4。最后将筛选获得的最优单点突变体 LipA-His¹⁵Pro 和 LipA-Ala²¹⁰Val 进行叠加突变。55 °C 下热处理 12 min 后, 突变体 LipA-His¹⁵Pro、LipA-Ala²¹⁰Val 和 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 的残余酶活较野生型分别提高了 29.9%、33.7% 和 60.0%。

2.4 野生型脂肪酶及其脂肪酶突变体 T_{50}^{12} 的测定

野生型脂肪酶与热稳定提高的脂肪酶突变体的 T_{50}^{12} 的测定结果如图 1。野生型脂肪酶

表 2. 脂肪酶 LipA 3D 分子结构中, 经 Castp、Voronioia 和 Cave 均预测出的空腔及其氨基酸残基组成
Table 2. Predicted cavities in the 3D structure of LipA using Castp, Voronioia and Cave, respectively

Cavity number	Cavity-lining residues	Castp	Voronioia	Cave	Cavity number	Cavity-lining residues	Castp	Voronioia	Cave	
1	Pro ¹¹³	+	+	+	7	Gln ²⁹²	+	+	+	
	Ser ¹¹⁷	+	+	+		Gly ²⁹⁵	+	+	+	
	Leu ¹⁶⁷	+	+	+		Val ²⁹⁶	+	+	+	
	Leu ²⁶⁶	+	+	+		Arg ²⁹⁷	+	+	+	
2	Asp ⁵⁵	+	+	+	8	Pro ³⁰⁴	+	+	+	
	Asp ⁵⁶	+	+	+		Ile ¹¹⁰	+	+	+	
	Gly ⁵⁷	+	+	+		Trp ²⁰⁹	+	+	+	
	Gly ⁶⁰	-	-	+		Trp ²⁸⁴	+	+	+	
	Glu ⁶³	+	+	+		Glu ²⁸⁹	+	+	+	
3	Tyr ⁹⁵	-	+	+	9	Pro ³⁰⁴	+	+	+	
	Ala ²¹³	-	-	+		Val ³⁰⁷	+	+	+	
	Ile ²¹⁴	+	+	+		Ile ³⁰⁸	+	+	+	
	Asp ²²⁸	+	+	+		Thr ¹¹²	-	-	+	
	Ser ²³⁰	-	-	+		Ser ²⁰⁸	+	+	+	
	Thr ²⁴⁵	+	+	+		Trp ²⁰⁹	+	+	+	
	Leu ²⁴⁸	+	+	+		Ala ²¹⁰	+	+	+	
	Phe ²⁴⁹	-	-	+		Ala ²⁷²	+	+	+	
	Asn ²⁸⁵	+	+	+		Leu ²⁷³	+	+	+	
	Asn ⁸²	+	+	+		Val ²⁷⁷	+	+	+	
4	Leu ⁸³	+	+	+	10	Thr ²⁸⁰	+	+	+	
	Val ⁸⁴	+	+	+		Ile ³³	+	+	+	
	Ser ¹⁰⁶	+	+	+		Asp ³⁶	+	+	+	
	Thr ¹⁰⁸	+	+	+		Leu ³⁷	+	+	+	
	Leu ³¹⁵	+	-	+		Val ³⁰⁵	+	+	+	
	Leu ¹³	-	+	+		Ile ³⁰⁸	+	+	+	
	His ¹⁵	+	+	+		Arg ³⁰⁹	+	+	+	
5	Thr ²⁰	+	+	+	11	Ser ²³⁰	+	+	+	
	Asp ²¹	+	+	+		Thr ²³¹	-	-	+	
	Tyr ²⁹	+	+	+		Asp ²⁴²	+	+	+	
	Trp ³⁰	+	+	+		Ser ²⁴⁴	+	+	+	
	Val ⁴⁶	+	-	+		Thr ²⁴⁵	+	+	+	
	Ala ⁴⁷	-	-	+		Asn ²⁸⁵	+	+	+	
	Gly ¹¹¹	+	+	+		Leu ²⁸⁷	+	+	+	
	Ala ²¹⁰	+	+	+		12	Ile ¹¹	+	+	+
	Gly ²¹¹	+	+	+			Leu ¹³	+	+	+
	Asn ²⁶³	+	+	+			Leu ³⁷	+	+	+
Asp ²⁶⁴	+	+	+	Val ⁸⁴	+		+	+		
Val ²⁶⁷	+	+	+	Ile ¹¹⁰	+		+	+		
Ser ²⁶⁸	+	+	+	Trp ²⁰⁹	+		+	+		
6	Lys ²⁶⁹	+	+	+	Ile ³⁰⁸	+	+	+		
	Ala ²⁷²	+	+	+	His ³¹¹	+	+	+		

+: Amino acids found in the predicted cavity; -: No appearance of amino acids in the predicted cavity.

表 3. 计算机辅助设计的脂肪酶 LipA 的突变体电子文库

Table 3. Computationally designed libraries for rapid lipase LipA stabilization

Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)	Cavity volume changes/ \AA^3	Mutation site	$\Delta\Delta G$ /(kcal/mol)	Cavity volume changes/ \AA^3
LipA-His ¹⁵ Pro	-2.027	-3.2	LipA-Val ²⁷⁷ Leu	-0.804	-40.3
LipA-Asp ²¹ Val	-0.573	-18.2	LipA-Thr ²⁸⁰ Leu	-2.324	-25.5
LipA-Asp ²¹ Met	-0.823	-18.2	LipA-Thr ²⁸⁰ Val	-1.871	-24.4
LipA-Asp ²¹ Arg	-1.061	-18.2	LipA-Thr ²⁸⁰ Phe	-0.628	-19.9
LipA-Asp ³⁶ Met	-0.656	-40.3	LipA-Thr ²⁸⁰ Met	-1.230	-25.8
LipA-Asp ³⁶ Ile	-0.661	-40.3	LipA-Asn ²⁸⁵ Val	-0.537	-21.3
LipA-Asp ⁵⁵ Val	-1.113	-12.6	LipA-Asn ²⁸⁵ Ile	-1.102	-21.3
LipA-Asp ⁵⁵ Ile	-1.548	-12.6	LipA-Glu ²⁸⁹ Val	-2.209	-7
LipA-Asp ⁵⁶ Met	-1.419	-12.2	LipA-Glu ²⁸⁹ Pro	-1.328	-14.2
LipA-Glu ⁶³ Pro	-0.927	-12.2	LipA-Glu ²⁸⁹ Lys	-2.169	-18.9
LipA-Glu ⁶³ Tyr	-0.581	-12.2	LipA-Glu ²⁸⁹ Ala	-1.269	-0.6
LipA-Asn ⁸² Leu	-0.962	-22.5	LipA-Glu ²⁸⁹ Gln	-2.370	-13.9
LipA-Val ⁸⁴ Ile	-0.617	-28.7	LipA-Glu ²⁸⁹ Thr	-0.843	-21.2
LipA-Ser ¹⁰⁶ Ala	-1.050	-5.3	LipA-Gln ²⁹² Met	-1.265	-10.7
LipA-Ser ¹⁰⁶ Ile	-0.943	-22.5	LipA-Val ²⁹⁶ Tyr	-0.618	-12.4
LipA-Ser ¹⁰⁶ Cys	-1.050	-22.5	LipA-Gln ²⁹² Leu	-1.577	-12.8
LipA-Ser ¹⁰⁶ Asn	-0.825	-5.3	LipA-Val ²⁹⁶ Trp	-0.688	-43
LipA-Thr ¹⁰⁸ Leu	-1.566	-22.5	LipA-Val ²⁹⁶ Phe	-0.766	-17.7
LipA-Ala ²¹⁰ Val	-1.043	-16.1	LipA-Val ²⁹⁶ Met	-1.008	-15.7
LipA-Ala ²¹⁰ Ile	-1.620	-54.1	LipA-Val ²⁹⁶ Lys	-0.567	-10.1
LipA-Ala ²¹⁰ Leu	-1.156	-54.1	LipA-Val ²⁹⁶ Leu	-0.848	-17
LipA-Ala ²¹⁰ Met	-0.659	-54.1	LipA-Val ²⁹⁶ Ile	-0.655	-56.4
LipA-Ala ²¹⁰ Cys	-0.577	-54.1	LipA-Arg ³⁰⁹ Leu	-1.5157	-40.3
LipA-Asp ²²⁸ Phe	-1.641	-21.3	LipA-Arg ³⁰⁹ Ile	-0.597	-20.8
LipA-Asp ²²⁸ Leu	-1.746	-21.3	LipA-Val ³⁰⁵ Leu	-0.524	-14.8
LipA-Asp ²²⁸ Met	-1.838	-8.1	LipA-His ³¹¹ Phe	-1.506	-9.2
LipA-Thr ²⁴⁵ Val	-1.530	-52.6	LipA-His ³¹¹ Met	-2.993	-41.2
LipA-Thr ²⁴⁵ Met	-0.511	-45.9	LipA-His ³¹¹ Leu	-2.587	-46.7
LipA-Leu ²⁶⁶ Phe	-1.029	-11.7	LipA-Ser ¹⁰⁶ Thr	-0.500	-22.5

表 4. 55 °C 处理 12 min 后不同突变体的残余酶活

Table 4. The residual activity of different mutants heated 12 min at 55 °C

Mutation site	Increase rate of residual activity/%	Mutation site	Increase rate of residual activity/%
LipA-His ¹⁵ Pro	29.9±2.9	LipA-Ala ²¹⁰ Leu	-35.8±0.9
LipA-Asp ²¹ Met	-1.4±5.8	LipA-Ala ²¹⁰ Cys	-18.0±7.0
LipA-Asp ²¹ Val	-10.0±4.8	LipA-Ala ²¹⁰ Met	n.d.
LipA-Asp ²¹ Arg	-11.9±0.5	LipA-Thr ²⁸⁰ Leu	n.d.
LipA-Asp ³⁶ Ile	n.d.	LipA-Asn ²⁸⁵ Val	n.d.
LipA-Glu ⁶³ Tyr	n.d.	LipA-Glu ²⁸⁹ Val	n.d.
LipA-Asn ⁸² Leu	n.d.	LipA-Val ²⁹⁶ Leu	-19.9±1.9
LipA-Val ⁸⁴ Ile	11.7±1.5	LipA-Ala ²¹⁰ Ile	7.8±0.7
LipA-Ala ²¹⁰ Val	33.7±2.0	LipA-His ¹⁵ Pro/Ala ²¹⁰ Val	60.0±5.7

n.d.: Not determined.

的 T_{50}^{12} 为 53 °C, 脂肪酶突变体 LipA-His¹⁵Pro、LipA-Ala²¹⁰Val 和 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 的 T_{50}^{12} 较野生型脂肪酶均有一定程度的提高, 分别为 57 °C、55 °C 和 61 °C (图 1)。

2.5 野生型脂肪酶及脂肪酶突变体 $t_{1/2}$ 的测定

野生型脂肪酶与热稳定脂肪酶突变体的 $t_{1/2}$ 的测定结果如图 2。野生型脂肪酶 LipA 的 $t_{1/2}$ 为 5.2 min, 而热稳定脂肪酶突变体 LipA-His¹⁵Pro、LipA-Ala²¹⁰Val 和 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 的 $t_{1/2}$ 分别为 50 min、15 min 和 120 min。

2.6 热稳定脂肪酶突变体 LipA 提高热稳定性的分子机制

LipA 分子第 15 位的组氨酸突变为脯氨酸后, 其所处的空腔体积减小了 3.2 Å³, 而第 210 位的丙氨酸突变为缬氨酸后, 其所处的空腔体积减小了 16.1 Å³ (图 3)。通过对蛋白质内部的疏水核心(hydrophobic core)进行理性设计改造, 缩小空腔体积, 提高蛋白质分子的疏水核心的包装度(packing), 有助于提高蛋白质分子的热稳定性^[25-26]。分子动力学模拟结果进一步表明: 热稳定性脂肪酶突变体 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 的 RMSD 曲线较野生型脂肪酶 LipA 的 RMSD 曲线明显降低(图 4)。

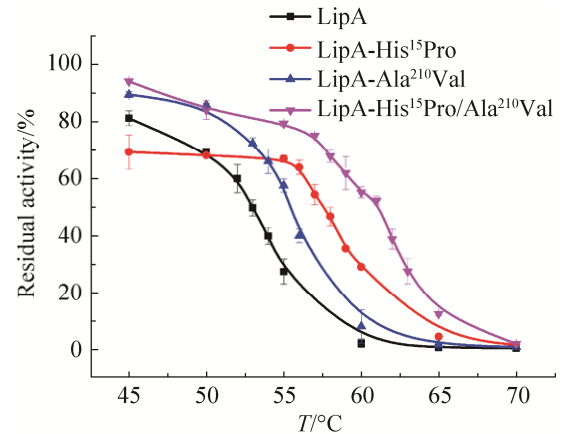


图 1. 野生型脂肪酶及其脂肪酶突变体 T_{50}^{12} 值的测定
Figure 1. The T_{50}^{12} of wild type lipase LipA and LipA mutants. Error bars represent standard errors.

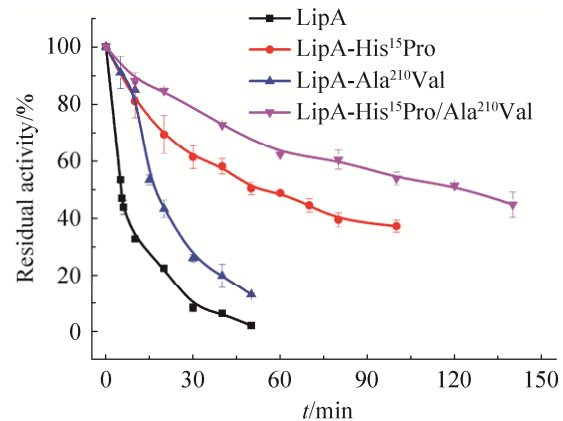


图 2. 野生型脂肪酶 LipA 及其热稳定突变体 $t_{1/2}$ 的测定
Figure 2. The $t_{1/2}$ value of wild type lipase LipA and LipA mutants. Error bars represent standard errors.

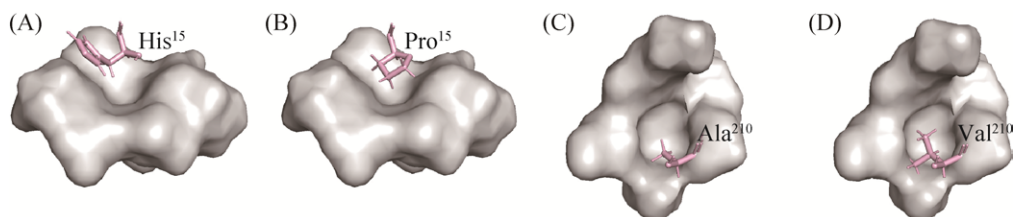


图 3. 两个阳性突变体突变前后的空腔结构

Figure 3. Cavity model of lipase A and lipase A mutants. A/B: Comparison of cavity volume between lipase LipA and lipase LipA-His¹⁵Pro; C/D: Comparison of cavity volume between lipase LipA and lipase LipA-Ala²¹⁰Val.

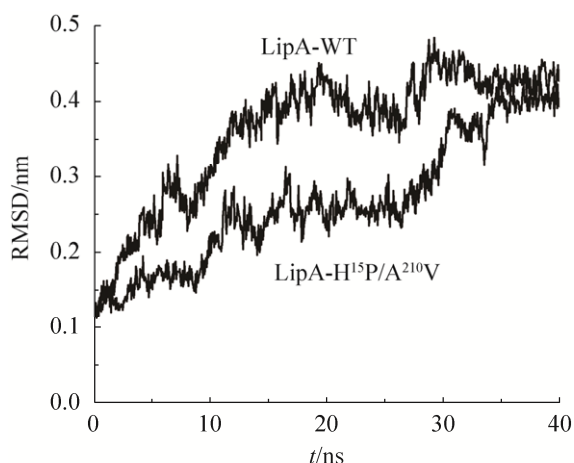


图 4. 野生型脂肪酶 LipA 及其突变体的 RMSD 值
Figure 4. The RMSD values of wild type lipase LipA and lipase LipA mutant.

3 讨论

本文利用生物信息学手段分析出伯克霍尔德菌脂肪酶 LipA 分子 3D 结构中共存在 12 个空腔, 并对其中的 11 个空腔进行了“空腔填充”突变(另外一个空腔由于突变体构建失败而未能考察)。实验结果表明: 脂肪酶突变体 LipA-His¹⁵Pro 和 LipA-Ala²¹⁰Val 的空腔体积缩小, 热稳定性有所提高。其中突变体 LipA-His¹⁵Pro 所在的空腔较突变前仅缩小了 3.2 Å³, 而突变体 LipA-Ala²¹⁰Val 所在的空腔较突变前缩小了 16.1 Å³ (表 3), 但突变体 LipA-His¹⁵Pro 的突变效应优于 LipA-Ala²¹⁰Val (图 2)。除了本文讨论的空腔效应外, 突变体 LipA-His¹⁵Pro 应该还存在其他影响脂肪酶突变体热稳定性的分子机制, 如解折叠自由能差($\Delta\Delta G$) (从表 3 中可以看出, 本位点突变导致 $\Delta\Delta G$ 降低了 2.027 kcal/mol), 或脯氨酸效应(His¹⁵所在位置为柔性区域)等。上述两个突变位点的叠加突变进一步提高了“空腔填充”效果, 叠加突变体 LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val 较野生型脂肪酶 LipA 在

55 °C 下的半衰期延长了 23.1 倍。使用本研究中的表达体系, *lipA* 基因及其对应的伴侣蛋白基因 *lipB* 未能实现高效表达, 因此本研究中未能纯化出重组脂肪酶 LipA 及其突变体, 并测定相应的比活力 (specificity)、米氏常数(K_m)及催化效率(K_{cat}/K_m)等。后续研究中, 我们将进一步优化表达体系, 提高 *lipA* 及 *lipB* 的表达量, 纯化出重组脂肪酶 LipA 及其对应的突变体, 并比较比活力、米氏常数及催化效率的差异, 以更好地理解突变效应及突变机制。

本文中我们并未对组成 11 个空腔的所有氨基酸残基进行突变。在第一轮筛选过程中, 基于氨基酸残基的 R 基团的大小、疏水性、空腔填充效应及突变体自由能变化值 $\Delta\Delta G$, 仅从每个空腔中选择一个有代表性的突变体进行验证是否存在“空腔填充”效应(表 3 和表 4)。经验证存在“空腔填充”效应的突变体所在的空腔(如 His¹⁵Pro 所在的第 5 个空腔和 Ala²¹⁰Val 所在的第 6 个空腔), 才进一步构建并验证组成该空腔的其他氨基酸残基突变体的突变效应。实验结果表明, 改造蛋白质分子内部的空腔, 利用具有较大 R 基团的疏水氨基酸残基替换, 可以取得较好的突变效应^[27]。但对位于蛋白质分子表面的空腔进行理性设计改造, 仅仅考虑“空腔填充”效应是不够的; 除此之外, 组成空腔的氨基酸残基的柔性(flexibility)、氨基酸残基与周围临近氨基酸残基的互作效应等, 对蛋白质分子的稳定性也存在显著的影响^[11]。

我们以具有重要工业应用价值的伯克霍尔德菌胞外脂肪酶 LipA 作为热稳定蛋白质理性设计(或半理性设计)改造的模型分子, 先后利用“B-factor”值进行定点饱和突变筛选热稳定脂肪酶 LipA 突变体^[15]; 理性设计盐桥构建热稳定脂肪酶

LipA 突变体^[16]及本文基于“空腔填充”效应构建热稳定脂肪酶 LipA 突变体。此外,我们还对胆固醇酯酶的 β -转角(β -turn)进行了优化设计,并基于“脯氨酸”效应理性设计胆固醇酯酶突变体(实验室尚未发表数据)。我们在实验中发现,各类理性设计热稳定蛋白质分子的方法中,基于盐桥效应构建的突变体突变效果相对较为理想;基于单一突变效应理性设计构建的热稳定突变体,很难突破 10–15 °C 的瓶颈(ΔT_m)^[28];多效应联合的多点突变虽然可以显著改善酶蛋白分子的热稳定性^[29],但在实验中我们也发现,即使突变位点远离活性中心(实验中,我们对脂肪酶 LipA 或胆固醇酯酶突变位点均限定为:距离活性中心催化三联体 Ser 侧链—OH 氧原子 12 Å 的范围外),但多点突变仍然经常导致酶蛋白的催化效率(K_{cat}/K_m)显著降低。如何平衡和取舍酶蛋白的热稳定性和催化效率,依然存在巨大的挑战。

致谢

感谢中国科学院武汉物理与数学研究所段漠杰博士和福建师范大学生命科学学院研究生江虹同学在分子动力学模拟中给予的指导和帮助。

参考文献

- [1] Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1999, 29: 119–131.
- [2] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235–251.
- [3] Pucci F, Rooman M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 42: 117–128.
- [4] Eijsink VGH, Gåseidnes S, Borchert TV, van den Burg B. Directed evolution of enzyme stability. *Biomolecular*

Engineering, 2005, 22(1–3): 21–30.

- [5] 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. *Chem Bio Chem*, 2014, 15(11): 1660–1672.
- [6] 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.
- [7] Hubbard SJ, Gross KH, Argos P. Intramolecular cavities in globular proteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1994, 7(5): 613–626.
- [8] Hubbard SJ, Argos P. Cavities and packing at protein interfaces. *Protein Science*, 1994, 3(12): 2194–2206.
- [9] Hubbard SJ, Argos P. A functional role for protein cavities in domain: domain motions. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 261(2): 289–300.
- [10] Merski M, Shoichet BK. Engineering a model protein cavity to catalyze the Kemp elimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(40): 16179–16183.
- [11] Joo JC, Pohkrel S, Pack SP, Yoo YJ. Thermostabilization of *Bacillus circulans* xylanase via computational design of a flexible surface cavity. *Journal of Biotechnology*, 2010, 146(1/2): 31–39.
- [12] Ece S, Evran S, Janda JO, Merkl R, Sterner R. Improving thermal and detergent stability of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase by rational enzyme design. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2015, 28(6): 147–151.
- [13] Liu YR, Qiu FJ, Shu ZY, Wang ZZ, Qiu LQ, Li X, Jiang XZ, Huang JZ. Purification and enzymatic characterization of the extracellular lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002. *Journal of Fujian Normal University (Natural Science Edition)*, 2014, 30(3): 100–105. (in Chinese)
刘艳如, 邱芳锦, 舒正玉, 王作镇, 邱黎清, 李欣, 江贤章, 黄建忠. 伯克霍尔德菌 ZYB002 胞外脂肪酶的分离纯化及其酶学性质分析. 福建师范大学学报(自然科学版), 2014, 30(3): 100–105.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Liu YR, Zhao BC, Dong PP, Qiu LQ, Huang JZ, Zhu XL, Wang ZZ, Shu ZY. Computer-aid screening of thermostable lipase LipA from *Burkholderia* sp. ZYB002. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(7): 1014–1025. (in Chinese)
- 刘艳如, 赵丙春, 董盼盼, 邱黎清, 黄建忠, 朱晓兰, 王作镇, 舒正玉. 理性设计盐桥构建伯克霍尔德菌脂肪酶热稳定突变体. *微生物学报*, 2017, 57(7): 1014–1025.
- [17] Dundas J, Ouyang Z, Tseng J, Binkowski A, Turpaz Y, Liang J. Castp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Web Server issue): W116–W118.
- [18] Rother K, Hildebrand PW, Goede A, Gruening B, Preissner R. Voronoia: Analyzing packing in protein structures. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D393–D395.
- [19] Buša J, Hayryan S, Hu CK, Skrivanek J, Wu MC. Enveloping triangulation method for detecting internal cavities in proteins and algorithm for computing their surface areas and volumes. *Journal of Computational Chemistry*, 2009, 30(3): 346–357.
- [20] Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P. Pep-fold: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Web Server issue): W498–W503.
- [21] 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.
- [22] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [23] Hiol A, Jonzo MD, Druet D, Comeau L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25(1/2): 80–87.
- [24] 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.
- [25] Abraham T, Abraham T, Pack SP, Yoo YJ. Stabilization of *Bacillus subtilis* lipase a by increasing the residual packing. *Biocatalysis*, 2005, 23(3/4): 217–224.
- [26] Lazar GA, Handel TM. Hydrophobic core packing and protein design. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, 2(6): 675–679.
- [27] Vriend G, Berendsen HJC, van der Zee JR, van der Burg B, Venema G, Eijsink VGH. Stabilization of the neutral protease of *Bacillus stearothermophilus* by removal of a buried water molecule. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1991, 4(8): 941–945.
- [28] Wijma HJ, Floor RJ, Janssen DB. Structure- and sequence-analysis inspired engineering of proteins for enhanced thermostability. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(4): 588–594.
- [29] Reetz MT, Carballeira JD, Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angewandte Chemie*, 2006, 118(46): 7909–7915.

Effect of cavity-filling mutations on thermostability of lipase LipA from *Burkholderia* sp.

Yanru Liu^{*}, Xin Li, Panpan Dong, Jianzhong Huang, 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] To improve the thermostability of lipase LipA from *Burkholderia* sp., a series of cavity-filled lipase LipA mutants were constructed and evaluated. [Methods] Amino acid residuals consisted of cavities in 3D structural model of lipase LipA were predicted using Castp, Voronoia and Cave, and then computational libraries of every amino acid residuals were constructed using software packages FoldX. The following types of mutants were excluded from the computational libraries: (1) volume of the cavity was increased; (2) value of free energy, $\Delta\Delta G$, was over -0.5 kcal/mol. Total 58 mutants were screened from the computational libraries, and 17 mutants were selected to verify the mutation effect. [Results] Thermostability of lipase mutants (LipA-His¹⁵Pro and LipA-Ala²¹⁰Val) were improved and T_{50}^{12} value of lipase LipA-His¹⁵Pro and lipase LipA-Ala²¹⁰Val increased by 4 °C and 2 °C, respectively. Thermostability of the superimposing mutant lipase LipA-His¹⁵Pro/Ala²¹⁰Val was further improved and the half-life ($t_{1/2}$) at 55 °C increased by 23.1 times. [Conclusion] Cavity-filling mutation was a feasible technique to improve the thermostability of lipase LipA from *Burkholderia* sp.

Keywords: *Burkholderia* sp., lipase LipA, cavity-filling mutation, T_{50}^{12} , half-life

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370802 and 31870787), by the Key Project from Science and Technology Bureau of Fujian Province (2013H0021) and by the Natural Science Funds of Fujian Province (2017J01441)

^{*}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: 8 October 2018; Revised: 25 January 2019; Published online: 27 February 2019