

基于半理性设计提高疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶催化特异性

马亚迪^{1,2}, 尤翠萍³, 张国强^{1,2*}, 李江华^{1,3*}, 堵国成^{1,3}

1 江南大学 未来食品科学中心, 江苏 无锡 214122

2 江南大学 粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

马亚迪, 尤翠萍, 张国强, 李江华, 堵国成. 基于半理性设计提高疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶催化特异性[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3481-3493.

MA Yadi, YOU Cuiping, ZHANG Guoqiang, LI Jianghua, DU Guocheng. Improving the position specificity of *Thermomyces lanuginosus* lipase based on semi-rational design[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3481-3493.

摘要: 甘油二酯(diacylglycerol, DAG)是油脂代谢的中间产物, 在人体中具有重要的生理功能, 主要通过脂肪酶水解油脂制备。但对 1,2-甘油二酯(1,2-diacylglycerol, 1,2-DAG)、1,3-甘油二酯(1,3-diacylglycerol, 1,3-DAG)的检测分离方法及脂肪酶的催化特异性的研究较少, 限制了其广泛应用。基于以上问题, 本研究首先通过超临界流体色谱与蒸发光散射检测器联用, 优化检测分析参数, 建立了 1,2-DAG (0.025–0.200 g/L)和 1,3-DAG (0.025–0.150 g/L)的高效定量检测方法。进一步基于疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL)与三油酸甘油酯的分子对接, 挑选了 5 个潜在底物结合位点并通过定点饱和突变构建了突变体库, 利用超临界流体色谱方法对突变体催化特异性进行筛选。突变文库中 I202V 表现出最高的 1,3-位置选择特异性, 较野生型 TLL 提高了 11.7%。本文基于半理性设计方法实现了对 TLL 位置催化特异性的改造, 并建立了一种能够高效分离检测 DAG 位置异构体的方法, 为脂肪酶催化特异性研究提供了参考。

关键词: 脂肪酶; 甘油二酯; 半理性设计; 超临界流体色谱; 位置异构体

资助项目: 江苏省自然科学基金(BK20202002)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (BK20202002).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Guoqiang, gqzhang@jiangnan.edu.cn; LI Jianghua, lijiainghua@jiangnan.edu.cn

Received: 2022-12-12; Accepted: 2023-02-01

Improving the position specificity of *Thermomyces lanuginosus* lipase based on semi-rational design

MA Yadi^{1,2}, YOU Cuiping³, ZHANG Guoqiang^{1,2*}, LI Jianghua^{1,3*}, DU Guocheng^{1,3}

1 Science Center for Future Foods, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Diacylglycerol (DAG) is an intermediate product in lipid metabolism and plays an important physiological role in human body. It is mainly prepared by hydrolyzing lipid with lipase. However, research on the detection method of 1,2-diacylglycerol (1,2-DAG) and 1,3-diacylglycerol (1,3-DAG) and catalytic specificity of lipase was not enough, which limits its wide application. To address these challenges, an efficient quantitative detection method was first established for 1,2-DAG (0.025–0.200 g/L) and 1,3-DAG (0.025–0.150 g/L) by combining supercritical fluid chromatography with evaporative light scattering detector and optimizing the detection and analysis parameters. Based on the molecular docking between *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) and triolein, five potential substrate binding sites were selected for site-specific saturation mutation to construct a mutation library for enzyme activity and position specificity screening. The specificity of sn-1,3 of the I202V mutant was the highest in the library, which was 11.7% higher than the specificity of the wild type TLL. In summary, the position specificity of TLL was modified based on a semi-rational design, and an efficient separation and detection method of DAG isomers was also established, which provided a reference for the study of the catalytic specificity of lipase.

Keywords: lipase; diglycerol; semi-rational design; supercritical fluid chromatography; position isomerism

甘油二酯(diacylglycerol, DAG)是油脂在人体代谢中产生的中间产物。根据两分子脂肪酸与甘油羟基的结合位点的不同, DAG 可以分为 1,2-甘油二酯(1,2-diacylglycerol, 1,2-DAG)和 1,3-DAG (1,3-diacylglycerol, 1,3-DAG)两种位置异构体^[1], 其中 1,3-DAG 具有较高的营养价值, 可以参与人体营养代谢^[2]。近来有研究表明 1,3-DAG 具有可以促进脂肪代谢^[3]、抑制人体内部的脂肪堆积^[4]、缓解慢性代谢疾病的重要生理功能^[5], 是国际公认的安全食品成分以及油脂开发的热点^[6]。目前工业中生产 1,3-DAG

主要通过脂肪酶特异性催化油脂生成^[7], 其中的难点一方面在于对 DAG 两种位置异构体的准确检测, 另一方面是脂肪酶在 sn-1,3 (stereo-specifically numbering-1,3, sn-1,3)位置特异性催化机制有待研究^[8-9]。

超临界流体是物质在高于临界压力和临界温度时呈现出的一种临界状态, 其不仅具有气体的低黏度、传质阻力小的优点, 也具有固体的高密度的特点^[10]。超高效合相色谱 (ultra-performance convergence chromatography, UPC²)是一类新型商品化的超临界流体色谱

(supercritical fluid chromatography, SFC)系统,是以超临界流体为主要流动相的色谱分析方法。UPC²与目前油脂检测常用的气相色谱法、高效液相色谱法相比,具有环保、分析时间短、分离效率高、分离条件温和等优点^[10-11]。

半理性设计策略是在已知部分或全部酶的序列、结构、催化机理等信息的基础上,预先找出具有改造潜力的位点,以定点饱和突变、组合位点饱和突变^[12]等策略构建相对较小的突变文库,从而提高对酶进化的效率^[13-14]。目前半理性设计已经成为改造脂肪酶底物特异性最常用、有效的策略之一,如 Yen 等^[15]对皱褶假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, CRL)底物结合口袋中的 2 个位点进行定点饱和突变,得到的突变体 L132A、L132I 成功提高了对中长链脂肪酸的特异性;而 Xu 等^[16]使用聚焦合理迭代位点特异性突变(focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM)策略对南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB)的立体选择性改造,在特定位点上使用精简的密码子构建了小而精的突变文库,成功得到了 4 个在立体选择性上互补的突变体。但目前利用半理性设计改造脂肪酶的位置选择性来提高 1,3-DAG 产量的相关研究相对较少,提高 1,3-DAG 产量的研究多集中于选择化学试剂优化催化反应条件、改善酶的固定载体等方面^[8],如 Zeng 等^[17]通过加入氯化胆碱抑制酰基转移来提高酶 sn-1,3 特异性;Cai 等^[18]通过改善脂肪酶的固定化载体提高了天然 sn-1,3 选择性酶的稳定性,进而提高了 DAG 产量。脂肪酶中的疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL)表现出较高的热稳定性和催化效率,具有巨大的工业应用潜力^[19]。但是天然 TLL 的 sn-1,3 选择性并不突出^[20],因此基于 TLL 的蛋白质结构应用半理性设计策略^[21]

来提高其 sn-1,3 选择性具有重要研究意义。

本文使用了一种新型的超临界流体色谱系统:UPC²,将其与蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detector, ELSD)联用,建立了快速准确分离、检测 1,3-DAG 与 1,2-DAG 的方法。为了提高 TLL 对于甘油三酯的 sn-1,3 位置选择性,本研究利用半理性设计策略对 TLL 底物结合口袋中的 5 个氨基酸进行改造,通过饱和突变的方法建立了突变文库,在经过对突变文库的酶活与位置特异性筛选后成功得到了 sn-1,3 位置特异性提升的突变体。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂和培养基

本文所涉及的巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、pPICHOLI-1-TLL 质粒为实验室保藏菌株及质粒。三油酸甘油酯、1,2-二油酸甘油酯、1,3-二油酸甘油酯、对硝基苯酚棕榈酸酯(*p*-nitrophenyl palmitate, *p*-NPP)购于 Sigma-aldrich 公司;氯化钙(AR, >97%)、阿拉伯树胶粉,购于上海麦克林生化科技有限公司;对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, *p*-NP)、正己烷(色谱纯)、甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),购于国药集团化学试剂公司;酵母粉、蛋白胨、无氨基酵母氮源(yeast nitrogen base without amino acids, YNB)、质粒抽提试剂盒、聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物纯化试剂盒、1 mol/L Tris-HCl 标准溶液、0.02%生物素,购于生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus)购于诺唯赞生物科技股份有限公司。

20 mmol/L *p*-NP 工作液:准确称量 0.069 6 g 的 *p*-NP,溶于 25 mL 的异丙醇中作为母液

(20 mmol/L *p*-NP), 取 1 mL 母液, 用异丙醇定容至 10 mL, 得到工作液(2 mmol/L *p*-NP 溶液)。

含 0.11% 阿拉伯树胶粉的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0): 准确称取 0.11 g 阿拉伯树胶粉溶于少量水中, 阿拉伯树胶溶液与 2 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 标准溶液一起移入 100 mL 容量瓶, 加入超纯水稀释至容量瓶标线, 振荡摇匀。

含 8 mmol/L CaCl₂ 的 200 mmol/L Tris-HCl 溶液: 称取 0.088 g 无水氯化钙溶于少量水中, 氯化钙溶液与 20 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 标准溶液一起移入 100 mL 容量瓶, 向容量瓶中加入超纯水至标线, 振荡摇匀。

2 mmol/L *p*-NP 溶液: 准确称取 0.278 g 对硝基苯酚溶于少量水中, 移入 1 L 容量瓶中定容。

p-NPP 原溶液: 准确称取 0.3 g 的 *p*-NPP 溶于少量异丙醇中, 移入 100 mL 容量瓶准确定容。

甘油三酯乳化液: 使用移液枪准确吸取 10 mL 三油酸甘油酯至烧杯中, 加入 30 mL 的 200 mmol/L Tris-HCl 溶液, 使用超声破碎仪破碎, 直至溶液成为均一白色乳化液。

0.025、0.05、0.075、0.1、0.15、0.2 g/L 的 1,2-二油酸甘油酯与 1,3-二油酸甘油酯标准溶液: 分别称取 0.02 g 1,2-二油酸甘油酯、1,3-二油酸甘油酯溶于 100 mL 正己烷中, 超声促进溶解。其他浓度梯度的溶液通过使用正己烷在一定比例下稀释 0.2 g/L 标准溶液得到。标准溶液放置于-40 °C 冰箱保存。

酵母浸出粉葡萄糖培养基(yeast extract

peptone dextrose medium, YPD)配方: 胰蛋白胨 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

最小缓冲甲醇培养基(buffered minimal methanol medium, BMM)配方: 酵母粉 10 g/L, 胰蛋白胨 20 g/L, 溶于 800 mL 去离子水, 100 mL 1 mol/L (pH 6.0) 磷酸缓冲液, 使用前加入 100 mL 10×YNB, 2 mL 0.02% 生物素。

流动相: 甲醇与乙腈以 50:50 (体积比) 配制, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 超声 30 min 去除其中气泡。

1.1.2 仪器和设备

ACQUITY UPC² 超高效合相色谱、ACQUITY UPC² BEH 色谱柱, 沃特世公司; 恒温水浴振荡器, 济南沃宏实验仪器有限公司; 移液枪、分析天平, Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶酶活测定方法

TLL 酶活采用 *p*-NPP 法来测定, *p*-NP 标准曲线制作方法如表 1 所示, 2 mmol/L *p*-NP 溶液作为工作液(working fluid), 含 0.11% 阿拉伯胶的 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0) 作缓冲液, 95% 乙醇作为终止液。酶活测定时将 *p*-NPP 原溶液与缓冲液以 1:9 (体积分数) 混匀作为底物溶液使用, 在 1.5 mL 离心管中加入 600 μL 底物溶液, 并加入 25 μL 稀释后的粗酶液, 在 40 °C 水浴保温 15 min, 加入 500 μL 95% 乙醇溶液(termination fluid) 终止反应, 离心 5 min, 在 410 nm 下测定上清液的吸光值。以野生型 TLL (wild type-TLL, WT-TLL) 酶活为 100%。

表 1 *p*-NP 标准曲线的制作

Table 1 Standard curve making of *p*-NP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Working fluid (μL)	0	1.875	3.75	7.5	15	22.5	30	45	60
Isopropanol (μL)	62.5	60.625	58.75	55	47.5	40	32.5	17.5	2.5
Buffer (μL)	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5	562.5
Termination fluid (μL)	500	500	500	500	500	500	500	500	500

酶活定义: 1 min 内催化水解底物 *p*-NPP 产生 1 μmol *p*-NP 所需的酶量为一个酶活单位(U)。

1.2.2 脂肪酶位置特异性测定

三油酸甘油酯与 4%阿拉伯树胶溶液以 1:3 (体积分数)混合, 超声破碎仪混匀直至成均一的乳白色液体, 将其作为底物溶液。在 5 mL EP 管中加入 200 μL 待测酶液、200 μL 缓冲液、600 μL 底物溶液, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 的条件下反应 6 h。反应完成后使用 2 mL 正己烷萃取产物。

1.2.3 超临界流体色谱测定 DAG

UPC² 与 ELSD 联用来分析脂肪酶对 DAG 的位置特异性, 仪器的具体参数如表 2 所示。为保证峰图、保留时间具有良好的重现性, 每次 UPC² 开机后, 首先使用流动相冲洗管路 10 min, 然后使用二氧化碳冲洗管路 30 min; 等待压力下降后安装色谱柱, 调整流速后压力上升, 采集基线 30 min; 最后使用甲醇清洗注射器、针头 3 次, 等待上述步骤完成后再分析样品。

1.2.4 突变位点预测

TLL 蛋白结构(PDB ID: 6OR3)来自于 RCSB 数据库^[22](<https://www.rcsb.org/pages/>

publications), 将蛋白结构导入 Schrödinger Maestro 软件^[23], 在其 Protein Preparation Wizard 模块处理蛋白结构, 去除结晶水, 补加缺失的氢原子, 并修复缺失键信息, 修补缺失肽段, 最后对蛋白进行能量最小化以及几何结构的优化。三油酸甘油酯结构来自于 PubChem 数据库^[24](<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), 导入 Chem3D 软件^[25]利用 MM2 模块进行优化以及能量最小化。在 Schrödinger Maestro 软件的 Glide 模块完成分子对接, 化合物结构按 Lig Prep 模块的默认设置制备, 在 Glide 模块中进行筛选时导入受体, 根据蛋白结构特点预测对接位点, 分析化合物和靶点蛋白的作用模式, 对结果进行评估。

1.2.5 单点饱和突变文库构建

通过 Schrödinger Maestro 软件的分子对接及结构分析结果, 本文选择了 Ile86、Ile90、Leu93、Ile202、Val203 共 5 个突变热点, 设计饱和突变引物, 简并密码子为 NNK, 使用的研究引物如表 3 所示。以重组载体 pPHICHO-1-TLL 为模板, 使用 PCR 方法进行定点突变。其中 PCR 反应体系的组成为 2 \times Phanta Max Master Mix (Dye Plus)溶液 25 μL , 模板(60 ng/ μL) 0.5 μL , 上下游引物各 1 μL , 去离子水 22.5 μL 。PCR 程序设置为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2.5 min, 共 28 个循环。PCR 产物经 *Dpn* I 消化、纯化后, 电转入 *E. coli* JM109 感受态中, 涂布 LB 平板(含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 博莱霉素), 挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基(含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 博莱霉素)中培养 12 h, 提取质粒后测序验证突变质粒。

1.2.6 脂肪酶摇瓶发酵

将 pPHICHO-1 载体、pPHICHO-1-TLL 重组载体以及测序完成的突变质粒分别电转入 *P. pastoris* GS115 感受态细胞中, 涂布 0.1 g/L YPD

表 2 仪器的设置参数

Table 2 Parameter setting module

Names	Parameters
Column	ACQUITY UPC ² BEH
Column temperature	60 $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase A	CO ₂
Mobile phase B	Methanol/Acetonitrile
Seal wash	1 mL
Weak wash volume	600 μL
Strong wash volume	200 μL
ABPR pressure	1 500 psi
Injected volume	2 $\mu\text{L}/5 \mu\text{L}/10 \mu\text{L}$
Flow rate	1.5 mL/min
Analysis time	13 min/16 min/20 min
ELSD gain	300/400/500
Drift tube temperature	(50 \pm 25) $^{\circ}\text{C}$
Gas pressure	40 psi
Nebulizer mode	Cooling

表 3 突变文库构建所用的引物

Table 3 Primers used to construct mutant library

Primer name	Primer sequence (5'→3')
I86X-F	TTTGTCTTTTAGAGGTTCTAGATCANNKGAAAATTGGA
I86X-R	TGATCTAGAACCTCTAAAAGACAAAACGATCAAC
I90X-F	GGTTCTAGATCAATTGAAAATTGGNNKGGTAATTTG
I90X-R	CCAAATTTCAATTGATCTAGAACCCTCTAAAAGACA
L93X-F	GAAAATTGGATTGGTAATNNKAACCTTCGATTTG
L93X-R	TTACCAATCCAATTTTCAATTGATCTAGAACCCTC
I202X-F	AGAATCACTCATACAAACGATNNKGTTCCTCAA
I202X-R	ATCGTTTGTATGAGTGATTCTGTACAAAGTAC
V203X-F	TCACTCATACAAACGATATCANNKCCAAGAT
V203X-R	GATATCGTTTGTATGAGTGATTCTGTACAAAGTAC

平板(含 0.1 g/L 博莱霉素), 30 °C 培养 3 d。挑取单菌落于 50 mL YPD 液体培养基中(含 100 μg/mL 博莱霉素), 置于 30 °C、200 r/min 摇床中避光培养 24 h。10% 的种子液转接 50 mL BMMY 液体培养基(含 100 μg/mL 博莱霉素), 加入 2% 甲醇诱导表达, 在 30 °C、200 r/min 摇床中发酵培养 4 d, 离心收集发酵上清液。

2 结果与分析

2.1 基于超临界流体色谱的 DAG 检测方法的构建与优化

2.1.1 超临界流体色谱方法的构建

一个高效、可靠的 DAG 位置异构体分析方法不仅能够提高对突变文库中正向突变体的鉴别能力, 也能节约实验时间提高效率。本研究尝试使用基于超临界流体色谱系统的 UPC² 来分析 1,3-DAG 与 1,2-DAG。DAG 溶液一般极性较弱, 具有较高的疏水性, 因此选择了具有广泛分离能力的 ACQUITY UPC² BEH 色谱柱。这种色谱柱在 pH 1.0–12.0 的范围内都能保持较好的柱稳定性。另外 DAG 的两种异构体对紫外检测器不够灵敏, 所以最终选择了 ELSD 作为检测装置。

不同的进样量会引起 ELSD 不同的响应值。高进样量会提高 ELSD 检测的信号强度和准确度, 降低背景噪声的干扰, 提高色谱柱对 DAG 的灵敏度, 但长时间维持高进样量更容易污染并损伤色谱柱, 引起分离度下降, 降低色谱柱的使用寿命。低进样量可以减少样品对色谱柱的污染, 但 ELSD 的信号强度也会降低, 影响峰图形状, 降低结果的准确度。实验结果表明采用 5 μL 进样量, 2 种 DAG 可以得到良好的分离, 峰图平滑、对称性良好。

UPC² 的流动相一般由超临界流体和有机相组成^[26]。UPC² 中常用的超临界流体有 CO₂ 流体、NH₃ 流体、N₂O 流体, 考虑到环境、安全、成本、泛用性等因素, 后续研究选择了无毒、无污染、价格低廉且对有机物溶解性最好的 CO₂ 流体作为 UPC² 的流动相 A^[27]。UPC² 流动相中的有机相 B 一般选择对油脂具有高洗脱能力的有机物溶剂, 如甲醇、乙醇、乙腈等^[26]。参考 Waters 公司公开的应用实例(Lipid Class Separation Using UPC²/MS|Waters), 本文选择甲醇乙腈混合物(50:50)作为流动相 B2。

2.1.2 超临界流体色谱方法的优化

UPC² 中洗脱梯度会影响 DAG 的保留时

间、分离度，因此设置了 A、B、C 三种不同的洗脱梯度来分析 0.1 g/L 1,2-DAG 和 0.1 g/L 1,3-DAG 的混合溶液，设置的具体梯度如表 4 所示。结果如表 5 所示，1,2-DAG、1,3-DAG 的保留时间在 3 种条件下出现了偏移，随着洗脱时间增加保留时间呈少许的增长趋势。如图 1 所示，两种 DAG 的峰距在 A 组、B 组中差距不大，

表 4 A、B、C 洗脱条件的梯度参数设置

Table 4 The elution gradient parameters of A, B and C

	Time (min)	CO ₂ (%)	Phase B (%)	Flow rate (mL/min)
A	0	98	2	
	5	95	5	
	10	80	20	
	11	98	2	
	13	98	2	
B	0	98	2	
	5	95	5	
	10	80	20	
	12	80	20	1.5
	13	98	2	
C	0	98	2	
	5	95	5	
	15	80	20	
	17	80	20	
	18	98	2	
	20	98	2	

表 5 A、B、C 洗脱条件下的 1,3-DAG、1,2-DAG 的保留时间、分离峰距离

Table 5 The retention time and peak separation distance of 1,3-DAG and 1,2-DAG of A, B and C

Experiment group	Retention time (min)		Peak separation distance
	1,3-DAG	1,2-DAG	
A	5.275	6.072	0.797
B	5.401	6.186	0.785
C	5.552	6.246	0.696

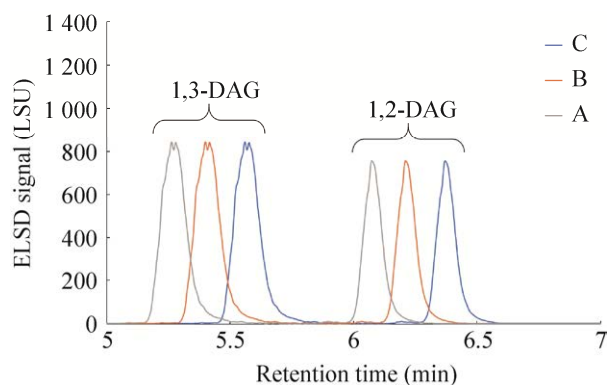


图 1 1,2-DAG、1,3-DAG 在 A、B、C 三种不同的洗脱梯度下的峰图

Figure 1 Peak of 1,2-DAG and 1,3-DAG at different elution gradients of A, B and C.

分别为 0.81 min、0.79 min，均大于 C 组的 0.67 min。分离度的差别可能是由于 A 组、B 组在 0–10 min 的洗脱梯度相同，而 C 需要 15 min 才能达到相同的洗脱浓度导致的。综上所述，最终选择了分离度更好且分析时间更短的 A 组。

ELSD 通过漂移管加热蒸发易挥发的流动相，检测样品颗粒散射光发出的光信号。光信号的大小与 ELSD 的增益值(gain)有关。增益值越高，对信号的放大强度越高，峰形更加明显尖锐，峰面积也更大，但样品中杂质的信号也会被随之放大，会带来更明显的背景噪声、误差。因此增益值不仅会影响峰形、峰面积，还会影响样品的检测范围。故本文希望找到一个合适的响应值使检测信号能够涵盖目标物的需求浓度范围：0.025–0.200 g/L 的 1,2-DAG 和 0.025–0.150 g/L 的 1,3-DAG。

本研究设置了增益值 300、增益值 400、增益值 500 三个梯度，对比了 0.025 g/L 1,3-DAG、0.025 g/L 1,2-DAG、0.150 g/L 1,3-DAG、0.200 g/L 1,2-DAG 在 3 种增益值下的峰形图以及峰面积，平行测定 3 次，响应值取平均值。结果如图 2 所示，对于 0.025 g/L 的 1,2-DAG 和 1,3-DAG，

在增益值 300 时吸收信号很小, 无法形成清晰易分析的峰图; 对于 0.15 g/L 1,3-DAG 和 0.20 g/L 1,2-DAG, 在增益值 500 时均达到了检测上限, 无法精准定量。因此只有增益值为 400 时, 其覆盖的两种 DAG 浓度范围都可以满足研究需求, 故选择增益值 400 作为 ELSD 的响应值。

在上述优化的色谱条件下, 平行测定不同浓度梯度的 1,2-DAG、1,3-DAG 的峰面积 3 次, 不含 DAG 的溶剂在 5–7 min 内无明显吸收峰。在 Waters UPC² 中的工作站建立方法, 解析 2 种不同浓度 DAG 的峰图数据, 积分计算峰面积。以溶液浓度为横坐标(x), 峰面积(y)为纵坐标, 绘制两种 DAG 的标准曲线, 结果如图 3 所示。两种 DAG 标准曲线的相关系数 R^2 均大于 0.99, 具有良好的线性关系, 能够满足后续实验研究需要。

2.2 突变文库构建与初筛

超临界流体色谱方法的构建为后续突变文库的有效筛选提供了方法支撑。故本研究着手构建突变文库, 以 Schrödinger Maestro 软件进行分子对接, 对接结果采用 Pymol 2.1 软件^[28]对酶与底物复合物进行可视化分析。分子对接得到的最优对接结果如图 4 所示, 三油酸甘油酯与 TLL 的底物结合口袋的结合模式较好, 二者能够形成稳定的复合物, 有良好的匹配度, 通过计算机分析在最优对接模型中二者的结合能为 -8.29 kcal/mol。三油酸甘油酯的油酸链主要通过结合口袋中的活性氨基酸残基形成疏水相互作用进行锚定, 其中与 sn-2 位油酸链产生疏水相互作用的氨基酸位点有 Ile86、Ile90、Leu93、Ile202、Val203, 其在底物口袋的空间位置如图 4 所示。

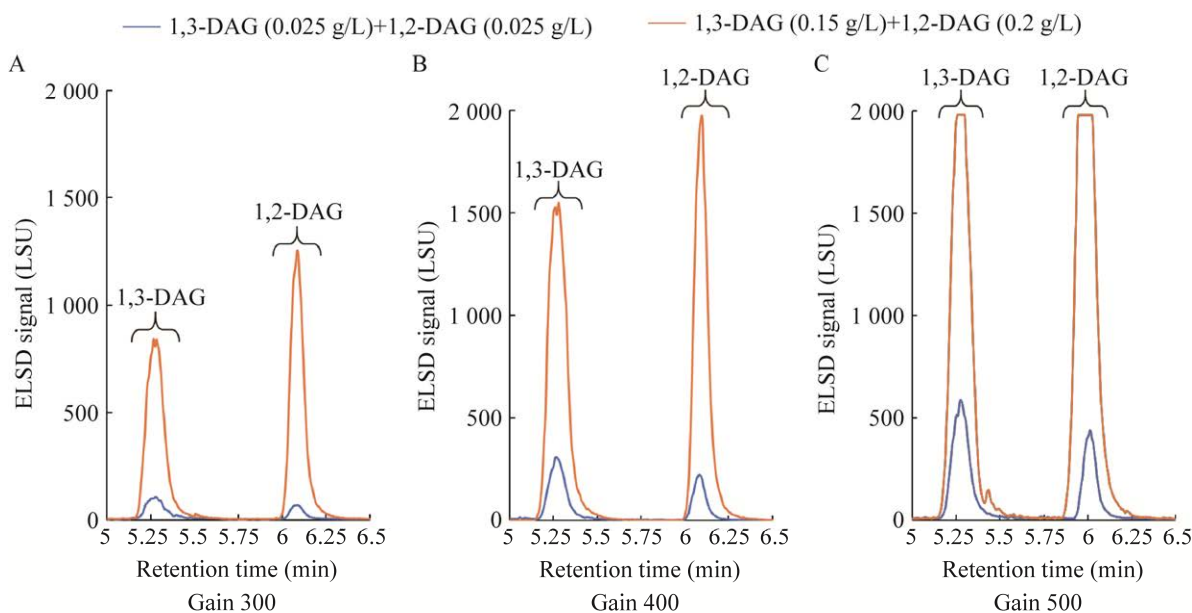


图 2 0.025 g/L 1,2-DAG、0.025 g/L 1,3-DAG、0.150 g/L 1,3-DAG、0.200 g/L 1,2-DAG 在增益值 300 (A)、增益值 400 (B)、增益值 500 (C) 时的峰图

Figure 2 Peak of 0.025 g/L 1,2-DAG, 0.025 g/L 1,3-DAG, 0.150 g/L 1,3-DAG, 0.200 g/L 1,2-DAG at gain 300 (A), gain 400 (B), and gain 500 (C).

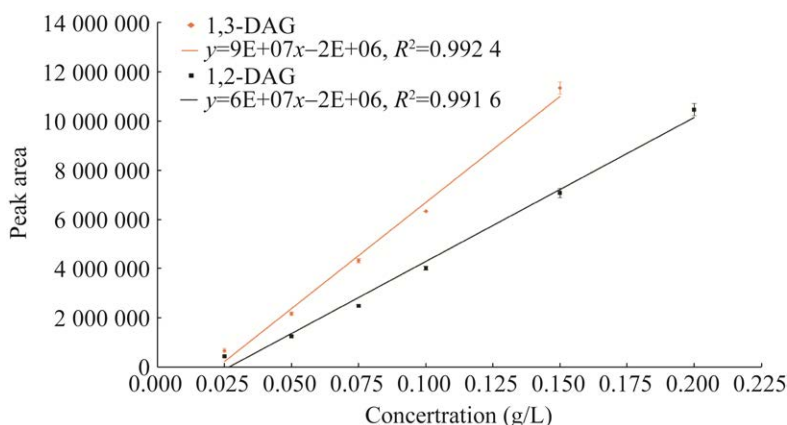


图3 1,2-DAG与1,3-DAG的标准曲线

Figure 3 Standard curve of 1,2-DAG and 1,3-DAG.

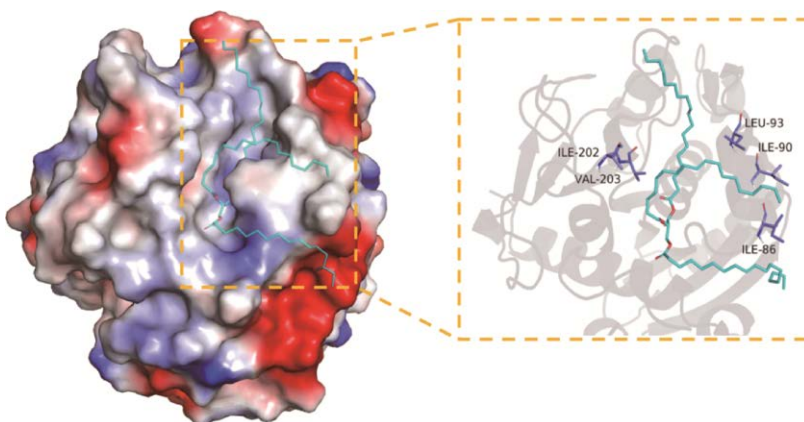


图4 三油酸甘油酯与TLL (PDB ID: 6OR3)的分子对接结果

Figure 4 Molecular docking result of triolein and TLL (PDB ID: 6OR3).

Sn-1,3 位置特异性的提高可以通过降低酶对底物的 sn-2 催化活性来实现,故本文模拟了三油酸甘油酯在底物口袋的结合过程,分析了三油酸甘油酯 sn-2 位油酸链在底物口袋的结合位置,选择 Ile86、Ile90、Leu93、Ile202、Val203 五个位点作为饱和突变位点。这些位点其在空间位置上靠近 sn-2 位油酸链并与其产生疏水相互作用力。通过推测这 5 个位点氨基酸残基的变化可能会影响 sn-2 位油酸链结合通道大小,也可能引起氨基酸与底物间相互作用力的改变,进而改变 sn-2 位油酸链在底物口袋的结合方式,影响 TLL 对 sn-2 位油酸链的催化活性。

因此,本研究选择这 5 个位点进行定点饱和突变,构建饱和突变体文库。

首先通过 *p*-NPP 法测定了 5 个位点所有饱和突变体(共 100 个)的酶活,将 WT-TLL 酶活作为 100%。筛选结果如图 5A 所示,与 WT-TLL 相比,共有 72 个突变体的酶活保持在 70%以上,有 9 个突变体的酶活提高,其中 V203M 的酶活最高,较 WT-TLL 酶活提高了 10%。为了在尽量保持酶活的基础上改善 TLL 的 sn-1,3 位置特异性,故选择了酶活降低不超过 30%的 72 个突变体进入下一轮催化位置特异性筛选。

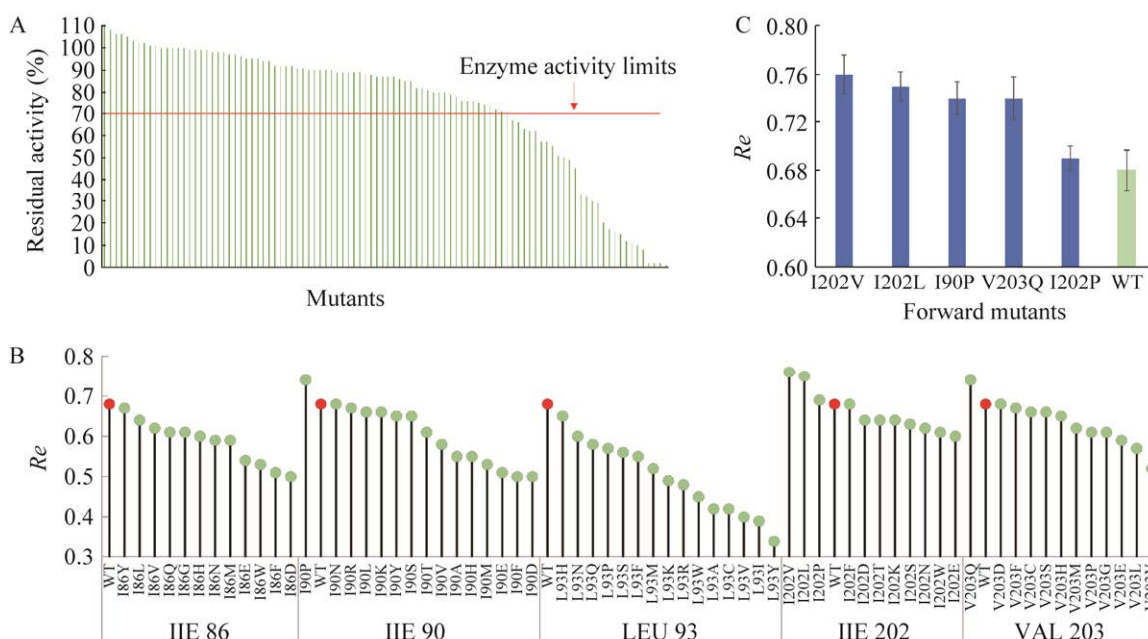


图5 脂肪酶突变体的酶活与催化特异性分析 A: 突变体的酶活分布, 100%代表 WT 酶活. B: 5 个位点的饱和突变体的催化特异性. C: 5 个正向突变体的催化特异性

Figure 5 Enzyme activity and specificity of TLL mutants. A: The enzyme activity of the mutant, 100% representing WT enzyme activity. B: Catalytic specificity of saturated mutants at five sites. C: Catalytic specificity of five forward mutants.

2.3 脂肪酶位置特异性突变体分析

基于优化后的超临界流体色谱方法对初筛后的突变文库进行进一步的位置特异性测定, 借助 Waters UPC² 工作站处理峰图, 计算两种 DAG 的峰面积, 根据图 3 的标准曲线计算对应的浓度。根据对映异构体过量值(enantiomeric excess, *ee*.)的定义, 定义了 DAG 的位置异构体过量值(regioisomeric excess, *re*)^[20]: $re = (a - b) / (a + b)$, 因本文使用水解反应测定 TLL 位置特异性, 为保证具有 sn-1,3 特异性的酶的 *re* 为正值, 将 *a* 调整为 1,2-DAG 含量、*b* 调整为 1,3-DAG 含量, *re* 越接近 1 代表 sn-1,3 特异性越强。本文将含有 pPHICHO-1 空载体的重组菌发酵液作为空白对照, 在相同条件下催化三油酸甘油酯水解, 由超临界流体色谱检测底物后发现无明显 DAG 响应峰, 证明了三油酸甘油酯在反应条件

下不会自然水解产生 DAG。

筛选结果如图 5B 所示, WT-TLL 的 *re* 值为 0.68, 研究发现 I90P、I202L、I202V、I202P、V203Q 5 个突变体表现出 *re* 值的提高, 分别为 0.74、0.75、0.76、0.69、0.74, 其中 I90P、I202L、I202V、V203Q 这 4 个突变体 *re* 值提高超过 5%。最优的突变体 I202V 的 *re* 值为 0.76, 比 WT-TLL 的 sn-1,3 特异性提高了 11.7% (图 5C)。此外, 突变体 L93Y 是 *re* 值降低最明显的突变体, 相比 WT-TLL 降低了 50%。

通过对文库的筛选本文成功得到了 sn-1,3 特异性增加的突变体, 这证明了对 sn-2 油酸链结合位置附近的氨基酸突变来影响底物特异性的策略是有效的。以 K-D 法测定的氨基酸疏水性参数为参考^[29-30], 我们发现 5 个正向突变体中的氨基酸残基变化均减弱了该位点的疏水

性, 其中 I202L、I202V 两个突变体在突变后 202 位点仍为疏水性氨基酸, 而在 I90P、I202P、V203Q 中亲水氨基酸替代了疏水氨基酸。这 5 个位点的突变均直接改变了底物口袋的疏水性, 可能影响了底物 sn-2 位油酸链与结合口袋之间产生的疏水相互作用力的强度, 或产生了新的相互作用力, 最终导致底物中 sn-2 位油酸链与口袋结合的稳定性与催化活性的改变。对于最优突变体 I202V, 其 202 位点突变为的缬氨酸仍具有较高的疏水性, 这表明适当降低疏水性可能最有益于 sn-1,3 特异性的提高, 且在 202 位的结构变化除了影响 202 位点, 也可能影响了相邻的 203 位点与底物之间的相互作用, 进而影响底物特异性。对于正向突变体, 氨基酸的大小、结构变化也可能引起了底物通道的改变进而影响特异性。

3 讨论

目前, 通过蛋白质工程方法改造脂肪酶 sn-1,3 位置特异性的相关研究较少, 本研究通过半理性设计策略成功实现了对脂肪酶 TLL 的 sn-1,3 位置特异性改造, 证明了半理性设计在改善脂肪酶位置特异性上的可行性。但改造后的 TLL 与某些天然脂肪酶如米根霉脂肪酶^[31] (*Rhizopus oryzae* lipase, ROL) 的 sn-1,3 位置特异性相比, 仍有较大的差距。为了进一步地提高 TLL 的 sn-1,3 位置特异性, 后续研究需要扩大 TLL 半理性设计范围, 并通过结构解析或计算模拟等进一步分析正向突变体结构-机制, 如借助分子动力学模拟^[32]等方法对突变前后结合口袋的构象变化、底物与结合口袋相互作用力的变化、TLL 催化甘油酯水解的机制等进行更深入的解析, 探究突变影响结构的具体机理。

本文建立了 UPC² 与 ELSD 联用以定量分析 1,2-DAG、1,3-DAG 的方法, 并优化了流动相、

洗脱梯度、增益值。该方法能够快速准确地分离并检测二油酸甘油酯的两种位置异构体, 满足筛选突变体的要求, 为 DAG 位置异构体的定量检测提供了有效方法。通过 Schrödinger Maestro 软件模拟了 TLL 与三油酸甘油酯的分子对接, 分析底物的结合模型后挑选了 5 个突变位点, 以饱和突变的方式构建了突变文库。初步筛选以酶活为指标, 排除了酶活下降超过 30% 的突变体。使用优化后的超临界流体色谱法对剩余突变体的底物特异性进行高效、精确地筛选, 其中 I202V 的 sn-1,3 特异性最高, *re* 值为 0.76, 较 TLL 提高了 11.7%, 而 sn-1,3 特异性最弱的是突变体 L93Y, 相比 TLL 降低了 50%。综上所述, 本文基于超临界流体色谱和半理性设计策略有效地改造了脂肪酶 TLL 催化特异性, 为拓展脂肪酶的工业应用提供了理论与技术参考^[1]。

REFERENCES

- [1] TAKANO H, ITABASHI Y. Analytical Chemistry related to Biofunctional Research. Molecular species analysis of 1, 3-diacylglycerols in edible oils by HPLC/ESI-MS[J]. *Bunseki Kagaku*, 2002, 51(6): 437-442.
- [2] MATSUO N. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods[J]. *Food Science and Technology Research*, 2004, 10(2): 103-110.
- [3] LO SK, TAN CP, LONG K, YUSOFF MSA, LAI OM. Diacylglycerol oil—properties, processes and products: a review[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2008, 1(3): 223-233.
- [4] FLICKINGER BD, MATSUO N. Nutritional characteristics of dag oil[J]. *Lipids*, 2003, 38(2): 129-132.
- [5] SAITO S, HERNANDEZ-ONO A, GINSBERG HN. Dietary 1,3-diacylglycerol protects against diet-induced obesity and insulin resistance[J]. *Metabolism*, 2007, 56(11): 1566-1575.
- [6] SATRIANA, ARPI N, LUBIS YM, ADISALAMUN, SUPARDAN M, MUSTAPHA W. Diacylglycerol-enriched oil production using chemical glycerolysis[J].

- European Journal of Lipid Science and Technology, 2016, 118: 1880-1890.
- [7] ZHONG NJ, LI L, XU XB, CHEONG LZ, ZHAO XH, LI B. Production of diacylglycerols through low-temperature chemical glycerolysis[J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 228-232.
- [8] PHUAH ET, TANG TK, LEE YY, CHOONG TSY, TAN CP, LAI OM. Review on the current state of diacylglycerol production using enzymatic approach[J]. Food and Bioprocess Technology, 2015, 8(6): 1169-1186.
- [9] LO SK, BAHARIN BS, TAN CP, LAI OM. Enzyme-catalyzed production and chemical composition of diacylglycerols from corn oil deodorizer distillate[J]. Food Biotechnology, 2004, 18(3): 265-278.
- [10] GHINET A, ZEHANI Y, LIPKA E. Supercritical fluid chromatography approach for a sustainable manufacture of new stereoisomeric anticancer agent[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, 145: 845-853.
- [11] de KLERCK K, MANGELINGS D, VANDER HEYDEN Y. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012, 69: 77-92.
- [12] REETZ MT, WANG LW, BOCOLA M. Directed evolution of enantioselective enzymes: iterative cycles of casting for probing protein-sequence space[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2006, 45(8): 1236-1241.
- [13] XIONG W, LIU B, SHEN YJ, JING KJ, SAVAGE TR. Protein engineering design from directed evolution to *de novo* synthesis[J]. Biochemical Engineering Journal, 2021, 174: 108096.
- [14] SINHA R, SHUKLA P. Current trends in protein engineering: updates and progress[J]. Current Protein & Peptide Science, 2019, 20(5): 398-407.
- [15] CHIH-CHUNG Y, MALMIS CONMAR C, GUAN-CHIUN L, LI-CHIUN L, JEI-FU S. Site-specific saturation mutagenesis on residues 132 and 450 of *Candida rugosa* lip2 enhances catalytic efficiency and alters substrate specificity in various chain lengths of triglycerides and esters[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(20): 10899-905.
- [16] XU J, CEN YX, SINGH W, FAN JJ, WU L, LIN XF, ZHOU JH, HUANG ML, REETZ MT, WU Q. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(19): 7934-7945.
- [17] ZENG CX, QI SJ, XIN RP, YANG B, WANG YH. ENZYMATIC SELECTIVE Synthesis of 1,3-dag based on deep eutectic solvent acting as substrate and solvent[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(11): 2053-2061.
- [18] CAI CS, GAO YQ, LIU Y, ZHONG NJ, LIU N. Immobilization of *Candida antarctica* lipase b onto sba-15 and their application in glycerolysis for diacylglycerols synthesis[J]. Food Chemistry, 2016, 212: 205-212.
- [19] MOROZKINA EV, SLUTSKAYA ES, FEDOROVA TV, TUGAY TI, GOLUBEVA LI, KOROLEVA OV. Extremophilic microorganisms: biochemical adaptation and biotechnological application (review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, 46(1): 1-14.
- [20] MENG X, XU G, ZHOU QL, WU JP, YANG LR. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles[J]. Food Chemistry, 2014, 143: 319-324.
- [21] ROMERO-RIVERA A, GARCIA-BORRÀS M, OSUNA S. Computational tools for the evaluation of laboratory-engineered biocatalysts[J]. Chemical Communications, 2017, 53(2): 284-297.
- [22] BURLEY SK, BHIKADIYA C, BI CX, BITTRICH S, CHAO H, CHEN L, CRAIG PA, CRICHLAW GV, DALENBERG K, DUARTE JM, DUTTA S, FAYAZI M, FENG ZK, FLATT JW, GANESAN S, GHOSH S, GOODSSELL DS, GREEN RK, GURANOVIC V, HENRY J, et al. RCSB protein data bank (RCSB.ORG): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D488-D508.
- [23] ZHU K, DAY T, WARSHAVIAK D, MURRETT C, FRIESNER R, PEARLMAN D. Antibody structure determination using a combination of homology modeling, energy-based refinement, and loop prediction[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2014, 82(8): 1646-1655.
- [24] KIM S, CHEN J, CHENG TJ, GINDULYTE A, HE J, HE SQ, LI QL, SHOEMAKER BA, THIESSEN PA, YU B, ZASLAVSKY L, ZHANG J, BOLTON EE. PUBCHEM in 2021: new data content and improved

- web interfaces[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
- [25] MCGUIRE R, VERHOEVEN S, VASS M, VRIEND G, de ESCH IJP, LUSHER SJ, LEURS R, RIDDER L, KOOISTRA AJ, RITSCHER T, de GRAAF C. 3D-E-CHEM-VM: structural cheminformatics research infrastructure in a freely available virtual machine[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2017, 57(2): 115-121.
- [26] DESFONTAINE V, GUILLARME D, FRANCOU E, NOVÁKOVÁ L. Supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 113: 56-71.
- [27] SAITO M. History of supercritical fluid chromatography: instrumental development[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 590-599.
- [28] MARTINEZ X, KRONE M, ALHARBI N, ROSE AS, LARAMÉE RS, O'DONOGHUE S, BAADEN M, CHAVENT M. Molecular graphics: bridging structural biologists and computer scientists[J]. *Structure*, 2019, 27(11): 1617-1623.
- [29] SIMM S, EINLOFT J, MIRUS O, SCHLEIFF E. 50 years of amino acid hydrophobicity scales: revisiting the capacity for peptide classification[J]. *Biological Research*, 2016, 49(1): 1-19.
- [30] KYTE J, DOOLITTLE RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.
- [31] ZHAO JF, LIN JP, YANG LR, WU MB. Enhanced performance of *Rhizopus oryzae* lipase by reasonable immobilization on magnetic nanoparticles and its application in synthesis 1,3-diacylglycerol[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2019, 188(3): 677-689.
- [32] CHEN CJ, HUANG YZ, XIAO Y. Enhanced sampling of molecular dynamics simulation of peptides and proteins by double coupling to thermal bath[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2013, 31(2): 206-214.

(本文责编 陈宏宇)