

K55R 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善 Improvement of the Thermostability of *Penicillium expansum* Lipase by Mutagenesis the Random Mutant Ep8 at K55R

蔡少丽, 林俊涵, 王彩梅, 林琳*

CAI Shao-Li, LIN Jun-Han, WANG Cai-Mei and LIN Lin*

福建师范大学生命科学学院, 福州 350007

College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

摘 要 利用重叠延伸 PCR 对扩展青霉脂肪酶(PEL)基因进行体外定点突变, 构建了 K55R 与随机突变体 ep8 叠加突变的重组质粒 pAO815-ep8-K55R。将该质粒电转化引入毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 进行异源表达。实验结果表明: 该叠加突变体在毕赤酵母中获得了活性表达, 得到表达产物脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS。其表达量为 508u/mL, 分别约为野生型脂肪酶 PEL-GS (627u/mL) 的 81%、随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS (924u/mL) 的 55%。其比活力为 2309.1u/mg, 与随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 和野生型脂肪酶 PEL-GS 的相仿。叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的最适作用温度为 37°C, 与野生型脂肪酶 PEL-GS 和随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 一致; 其 T_m 值为 41.0°C, 比野生型脂肪酶 PEL-GS 提高了 2.3°C, 比随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 提高了 0.8°C。表明叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的热稳定性有了进一步的提高。

关键词 扩展青霉脂肪酶, 叠加突变, 热稳定性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0677-04

Abstract In order to improve the thermostability of the *Penicillium expansum* Lipase (PEL), the lipase encoding genes was mutated by site-directed mutagenesis. A recombinant vector pAO815-ep8-K55R which contain double mutant genes was constructed by overlap extension PCR using the cDNA of a random-mutant lipase ep8 (a single site mutant) as the template and two special primers were used to generate another mutation site K55R. The recombinant vector was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation and the recombinant mutant GS-pAO815-ep8-K55R can secret double-mutant lipase PEL-ep8-K55R-GS into the medium when it was induced by Methanol. The yield of the double-mutant lipase is 508u/mL, which is 81% that of the wild type lipase PEL-GS (627u/mL) and 55% that of random-mutant PEL-ep8-GS (924u/mL). The specific activity of double-mutant lipase is 2309.1u/mg, which is similar to random-mutant lipase PEL-ep8-GS and the wild type lipase PEL-GS. The optimum temperature of the double-mutant lipase is same with the wild type lipase PEL-GS and random-mutant lipase PEL-ep8-GS. While the T_m of the double-mutant lipase is 41.0°C, 2.3°C higher than the wild type lipase PEL-GS and 0.8% higher than the random-mutant lipase PEL-ep8-GS, indicating that the double-mutant lipase PEL-ep8-K55R-GS has higher thermostability.

Key words *Penicillium expansum* lipase, double-mutagenesis, thermostability

Received: November 13, 2006; Accepted: February 13, 2007.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30270033), the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. B0120001 and C0410009) and the Platform Establishing Project for Industrial Microbiology R&D of Fujian Province (No. 2006H0085).

* Corresponding author. Tel: +86-591-22868209; E-mail: benbo_00@yahoo.com jinlin@fjnu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30270033), 福建省自然科学基金(No. B0120001 和 C0410009), 福建省工业微生物研发平台建设项目(No. 2006H0085)资助。
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

扩展青霉 PF898 是经多代诱变育种而获得的碱性脂肪酶高产菌株,该脂肪酶可在碱性条件下分解三酰甘油产生脂肪酸及甘油^[1,2]。在洗涤添加剂、有机合成、皮革毛皮脱脂、造纸、医药等工业上有着广泛的应用。本课题组已完成对扩展青霉碱性脂肪酶(PEL)基因的克隆和序列分析^[3,4],并实现了该基因在大肠杆菌、酿酒酵母和毕赤酵母中的表达^[5,6]。该脂肪酶是中温酶,对热敏感,在实际应用中易失活,而废纸脱墨、生物柴油制造等应用均需要稳定性高的脂肪酶。提高该酶的热稳定性是该酶更好地应用于生产实际的关键。目前,本课题组采用蛋白质工程技术对该脂肪酶进行改造,以提高该脂肪酶的热稳定性。本研究以扩展青霉脂肪酶单点突变体 ep8 (另文报道)为基础,引入 K55R 突变点,构建了叠加突变体。本文报道了该突变体的构建及特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: *Pichia pastoris* GS115、pBluescript II SK、*E. coli* Top10F'、pAO815 等由本课题组保藏。ep8 是由本课题组获得的含有一个突变点的随机突变体(其表达产物脂肪酶最适作用温度与野生型脂肪酶的一致,都为 37℃;其 T_m 值为 40.2℃,比野生型的提高了 1.5℃)。

1.1.2 酶与试剂:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。PCR 所用试剂为上海生物工程技术服务有限公司产品。其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.1.3 培养基与酶活检验板:LB、YPD、MD、MGY、MMY、YPOM 均按 Invitrogen 公司操作手册“推荐方法配制或加以改良,橄榄油检验板为含 1.0% 橄榄油的琼脂板。

1.1.4 寡核苷酸引物:引物 I :5'- ATA AGC TTG ATA TAC GTA ATG - 3';引物 II :5'- TGC AGG AAT TCG ATC TCA - 3';引物 III :5'- GGT CTT CCT CTC GGT GGA GT - 3';引物 IV :5'- CCA CCG AGA GGA AGA CCA TC - 3'。其中引物 I、引物 II 为 3'和 5'端引物,引物 III 和引物 IV 为突变引物,以上引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 定点突变:利用重叠延伸 PCR 方法进行定点突变:①第一轮基因片段的扩增:以 ep8 为模板,分别以 I 和 III, II 和 IV 为引物,95℃ 2min;94℃ 50sec;48℃ 45sec;72℃ 1min(10 个循环);94℃ 50

sec;51℃ 45 sec;72℃ 1min(20 个循环);最后,72℃ 延伸 10min,获得大小分别为 240bp 和 610bp 的基因片段;②第二轮全长基因的扩增:低熔点琼脂糖凝胶挖块法回收第一轮 PCR 扩增产物,并以此为模板,以 I, II 为引物,95℃ 2min;94℃ 50sec;37℃ 45sec;72℃ 90sec(5 个循环);94℃ 50sec;45℃ 45sec;72℃ 90sec(30 个循环),最后,72℃ 延伸 10min,PCR 扩增全长叠加突变体基因。

1.2.2 重组表达质粒的构建及转化:全长基因 PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶挖块法回收后,与经 *EcoR* V 线性化的载体 pBluescript II SK 连接,转化 *E. coli* Top10F' 感受态钙细胞,蓝白斑筛选重组子并用酶切鉴定法鉴定,筛选出的重组子经 *EcoR* I 酶切切出脂肪酶基因并用低熔点琼脂糖凝胶挖块法回收该片段,再将此片段与经 *EcoR* I /去磷酸化的克隆载体 pAO815 连接,转化 *E. coli* Top10F' 感受态钙细胞,酶切鉴定筛选重组表达质粒,并对其测序以确定突变克隆。

1.2.3 DNA 序列测序:DNA 序列由宝生物工程(大连)有限公司测定。

1.2.4 电转化酵母细胞 GS115 及筛选:*Sal* I 线性化 pAO815-ep8-K55R 后,电转化至宿主毕赤酵母 GS115,将转化物涂布于 MD 平板上,28℃ 培养 2~3d,将在 MD 平板上生长的转化子用牙签点至 YPOM 板上,28℃ 培养 3~4d,挑取 YPOM 板上透明圈大的转化子进一步诱导表达。

1.2.5 转化子的诱导表达:用牙签将筛选到的酵母阳性转化子挑至 MGY 培养基,28℃ 振荡培养 16~20h 至 OD_{600} 为 2~6 时离心收集菌体,用 MMY 培养基稀释至 OD_{600} 为 1,每隔 24h 添加 1.5% 甲醇诱导表达。

1.2.6 表达产物鉴定:用橄榄油检验板和灿烂绿检测活性,SDS-PAGE 检测目的蛋白表达水平和相对分子质量。

1.2.7 酶活力测定:以橄榄油为底物,采用 NaOH 滴定法^[7]。

1.2.8 酶最适作用温度测定:以橄榄油为底物,在 25~55℃ 范围内每隔 5℃ 反应 10min,测定野生型脂肪酶 PEL-GS、随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS、叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 酶活力,以相对活力对温度作图,获得酶的最适作用温度。

1.2.9 酶热稳定性测定:将叠加突变脂肪酶(PEL-ep8-K55R-GS)、随机突变脂肪酶(PEL-ep8-GS)和野生型脂肪酶(PEL-GS)在 30~40℃ 范围内,每隔 5℃ 在

在 40 ~ 45℃ 范围内,每隔 1℃ 进行热稳定性测定。将各脂肪酶液在各温度下温浴 30min 后,迅速转入 0℃ 冰浴中放置 30min,在最适作用温度条件下,测定酶的活性。以未经温浴处理条件下所测得的酶活为 100%,将经过不同温度热处理后所测得的酶活折合为相对剩余酶活力,对温度作图。相对剩余酶活力为 50% 时所对应的温度为酶的 T_m 值^[8]。

2 结果

2.1 叠加突变基因的获得

以含有一个突变点的随机突变体 ep8 的 cDNA 为模板,采用重叠延伸 PCR 法引入第二个突变点 K55R。第一轮 PCR 获得了大小分别为 246bp 和 609bp 的两个基因片段,第二轮 PCR 得到大约为 880bp 的引入 K55R 突变点的全长双突变脂肪酶基因。

2.2 叠加突变表达质粒的构建及在毕赤酵母中的表达

用 *EcoR* I 酶切重组质粒 pSK-ep8-K55R,将切下的目的基因片段连入质粒 pAO815,构建重组质粒 pAO815-ep8-K55R。经 *Xho* I / *Bam*H I、*EcoR* I 酶切鉴定和 DNA 测序结果表明:pAO815-ep8-K55R 确实在单点突变体 ep8 基础上引入了 K55R,从而构建了 ep8 与 K55R 叠加突变脂肪酶表达质粒 pAO815-ep8-K55R。将该表达质粒通过电转化引入毕赤酵母 GS115,通过 YPOM 平板和摇瓶发酵筛选获得高表达的叠加突变体表达菌 GS-pAO815-ep8-K55R。

2.3 叠加突变体的表达及特性

2.3.1 叠加突变体的表达 摇瓶发酵叠加突变体表达菌 pAO815-ep8-K55R-GS 120h,将其发酵液离心,取上清液进行橄榄油琼脂板酶活分析,NaOH 滴定法酶活测定及 SDS-PAGE 分析。结果表明:(1)叠加突变体在毕赤酵母中获得表达(Fig. 1)。其表达蛋白相对分子质量约为 28kD,与野生型和随机突变体的一致。(2)叠加突变体在毕赤酵母中获得活性表达和正确修饰,表达蛋白具有与野生型相似的比活,但表达量有所下降。与野生型及单点突变的随机突变体相比,叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 形成的透明圈小,蛋白表达量有所下降(Fig. 1, Fig. 2)。用 NaOH 滴定法测得叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 在最适作用温度下的发酵酶活为 508 u/mL,约为野生型脂肪酶 PEL-GS 的 81%,随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 的 55%。但比活力为 2309.1 u/mg,与随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 和野生型脂肪酶 PEL-GS 的相仿。

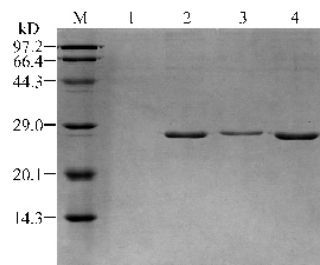


图 1 PEL-ep8-K55R-GS 发酵上清液的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of fermentation of the double-mutant lipase PEL-ep8-K55R-GS
1: negative control; 2: PEL-GS; 3: PEL-ep8-K55R-GS; 4: PEL-ep8-GS; M: protein marker.

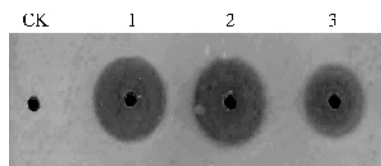


图 2 突变体脂肪酶的活性检测

Fig. 2 Detection for activity of mutant lipase
CK: negative control; 1: PEL-GS; 2: PEL-ep8-GS; 3: PEL-ep8-K55R-GS.

2.3.2 最适作用温度与热稳定性 在不同温度下进行脂肪酶的酶活测定,结果表明叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的最适作用温度为 37℃,与野生型脂肪酶 PEL-GS 和随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 的一致。

将野生型脂肪酶 PEL-GS、随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 和叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 在不同温度下保温半小时后进行酶活测定,观察其热稳定性(Fig. 3)。结果显示:野生型脂肪酶 PEL-GS 和随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 在 40℃ 下保温 30min 酶活丧失了 65% 和 38%,而叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 仍保留 89% 的酶活。在 41℃ 下保温 30min 野生型脂肪酶 PEL-GS 和随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 则丧失 90% 以上的活性,而叠加突变脂肪酶尚有 50% 的活性。计算结果表明:野生型脂肪酶 PEL-GS、随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 和叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的 T_m 值分别为 38.7℃、40.2℃ 和 41.0℃。叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的 T_m 值比野生型脂肪酶 PEL-GS 的提高 2.3℃,比随机突变脂肪酶 PEL-ep8-GS 提高 0.8℃。可见,叠加突变脂肪酶 PEL-ep8-K55R-GS 的热稳定性比野生型和单点突变的随机突变脂肪酶有了进一步的提高。

3 讨论

酶的稳定性问题一直是科学研究和生产实践共

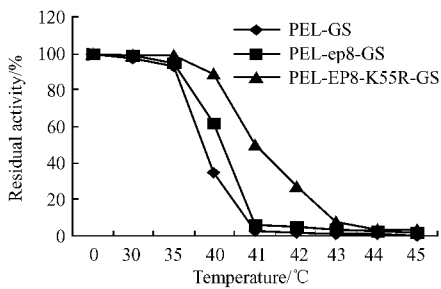


图3 野生型、随机突变体和叠加突变体表达产物的热稳定性

Fig. 3 Thermostability of the wild type, the random-mutant and the double-mutant lipase

同关注的问题,而稳定性的分子基础与蛋白质折叠等问题的分子基础是紧密相关的,酶稳定性工程既是商业关注的又是科学所感兴趣的^[9]。稳定性好意味着易保存(保存期长)、运输方便、使用效率高,意味着应用范围的扩大,也意味着低成本和高产出。目前应用的各种商业酶都不可避免地要讲稳定性。扩展青霉脂肪酶的热稳定性问题一直是局限其应用的一个重要问题。如何提高其热稳定性,目前国际上主要从两个方面入手:一是从化学修饰角度改造,二是从分子改性角度改造。本研究正是采用分子改性手段对扩展青霉脂肪酶热稳定性进行改造的。在对 PEL 与其他同源性较高的脂肪酶进行同源比较的基础上,对其进行了三维结构的计算机模拟,模拟结构显示 Lys55 可能位于 α -螺旋处,如将其突变为 Arg,可能会增加蛋白质的盐桥和氢键,稳定 α -螺旋,提高蛋白质的热稳定性。实验结果表明,相对于野生型而言, ep8 单点突变使 T_m 值提高了 1.5°C; K55R 与 ep8 的叠加突变使 T_m 值提高了 2.3°C;叠加突变脂肪酶的 T_m 值比随机突变脂肪酶的提高 0.8°C。叠加突变脂肪酶热稳定性进一步提高的原因可能是新形成的 Arg 含有一个胍基,比 Lys 有更高的 pK α 值,在高温下更能维持蛋白质的盐桥和氢键。

利用蛋白质工程手段改造脂肪酶热稳定性有多个成功的例子。如 Kohno 等利用蛋白质工程使 *Rhizopus niveus* 脂肪酶热稳定性提高了 15°C^[10]。Hecky 通过易错 PCR 和 DNA Shuffling 使 β -lactamase 的最适温度提高了 15°C^[11]; Acharya 使 *B. subtilis* 脂肪酶的半衰期增加了 300 倍^[12]; Palackal 使 Xylanase XYL7746 的 T_m 增加了 33°C^[13] 等等,可见,分子改造是一个行之有效的提高酶的热稳定性的手段。

本研究得到的叠加突变脂肪酶的 T_m 比野生型增加了 2.3°C,是两个点突变叠加的结果。由于对热稳定性有贡献的点突变对酶的热稳定性的提高具

有叠加作用^[14],本研究的后续工作将进一步进行含有多个热稳定性正向突变点的叠加体的构建,以进一步提高该脂肪酶的热稳定性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Shi QQ (施巧琴). Studies on alkaline lipase I: Screening and purification of the microorganisms. *Microbiology* (微生物学通报), 1981, 8: 109-110.
- [2] Zheng Y (郑毅), Huang JX (黄建中), Shi QQ (施巧琴), et al. Purification and some properties of alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Industrial Microbiology* (工业微生物), 1996, 26(3): 15-18.
- [3] Lin L (林琳), Xie BF (谢必锋), Yang GZ (杨冠珍), et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学学报), 2002, 18(1): 32-37.
- [4] Lin L (林琳), Xie BF (谢必锋), Yang GZ (杨冠珍), et al. Cloning and sequence analysis of genomic DNA encoding alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (中国生物化学与分子生物学学报) 2003, 19: 12-14.
- [5] Yuan C (袁彩), Lin L (林琳), Shi QQ (施巧琴), et al. Overexpression of *Penicillium expansum* lipase in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, 19: 231-235.
- [6] Li SQ (李生强), Yuan C (袁彩), Lin L (林琳). Expression vector construction and expression of alkaline lipase gene from *Penicillium expansum*. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)* (福建农林大学学报 自然科学版) 2003, 32: 259-262.
- [7] Beisson F, Tiss A, River C, et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Technol* 2002, 2: 133-153.
- [8] Nagao T, Shimada Y, Sugihara A, et al. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 17, 2002: 125-132.
- [9] Eijsink VG, Gaseidnes S, Borchert TV, et al. Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng*, 2005, 22(1-3): 21-30.
- [10] Kohno M, Enatsu M, Takee R, et al. Thermal stability of *Rhizopus Niveus* lipase expressed in a *kex2* mutant yeast. *Journal of Biotechnology*, 2000, 81: 141-150.
- [11] Hecky J, Muller KM. Structural perturbation and compensation by directed evolution at physiological temperature leads to thermostabilization of beta-lactamase. *Biochemistry*, 2005, 44(38): 12640-12654.
- [12] Acharya P, Rajakumara E, Sankaranarayanan R, et al. Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase. *J Mol Biol* 2004, 341(5): 1271-1281.
- [13] Palackal N, Brennan Y, Callen WN, et al. An evolutionary route to xylanase process fitness. *Protein Sci*, 2004, 13(2): 494-503.
- [14] Wells JA. Additivity of mutational effects in proteins. *Biochemistry*, 1990, 29: 8509-8517.