脂肪酶热稳定性改造研究进展

谭中标[1]，李剑芳[2]，邬敏辰*[3]，殷 欣[1]，胡 蝶[1]，董运海[2]
（1. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；3. 江南大学 无锡医学院，江苏 无锡 214122）

摘要：热稳定性改造是脂肪酶酶学性质研究的热点之一，随着技术的发展，越来越多的有效手段被用于脂肪酶热稳定性改造。作者综述了影响脂肪酶热稳定性的主要因素、提高其热稳定性的研究方法以及最新研究成果，为脂肪酶的进一步改造提供依据，并对其他酶的酶学性质改造具有借鉴意义。

关键词：脂肪酶；热稳定性；随机突变；定向进化；定点突变
中图分类号：Q 556.1　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)07—0673—09

Research Advance on Engineering Thermostability of Lipase

TAN Zhongbiao[1]，*LI Jianfang*[2]，*WU Minchen*[*3]，*YIN Xin*[1]，*HU Die*[1]，*DONG Yunhai*[2]
（1. School of Biotechnology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；3. Wuxi Medical School，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：Engineering thermostability of lipase is a hot topic of improving properties of the enzyme. With the development of technology，more and more effective means are used in engineering thermostability of lipase. This paper summarizes the main factors influencing the thermostability of lipase，methods to improve it and the latest research results on it. It could provide a basis for further research on lipase and a reference for altering character of other enzymes.

Keywords：lipase，thermostability，random mutagenesis，directed evolution，site-directed mutagenesis

脂肪酶(EC 3.1.1.3)即三脂酰甘油酯水解酶，能在油水界面催化三脂酰甘油酯水解为脂肪酸和甘油，还可以在疏水介质中催化转酯、酯化、酯交换等反应[1]。它广泛应用于食品加工、手性化合物拆分、洗涤剂、造纸、废水处理及生物柴油等领域[2]。脂肪酶在工业应用中，往往需要或遇到高温环境（温度通常会超过 45 ℃）。天然脂肪酶热稳定性普遍较差，这阻碍了其应用范围。

提高脂肪酶的热稳定性，可通过对酶进行化学修饰或分子改造而实现。分子改造方法包括随机突变（Random Mutagenesis），定向进化（Directed Evolution）和定点突变(Site-Directed Mutagenesis)等[3]。

收稿日期：2014-03-10
基金项目：国家自然科学基金项目(20776061)。
作者简介：谭中标(1980—)，男，江苏连云港人，发酵工程博士研究生，主要从事发酵工程研究。E-mail：tzbzb@126.com
* **通信作者**：邬敏辰(1962—)，男，江苏无锡人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程研究。E-mail：biowmc@126.com

定向进化和定点突变改造酶的热稳定性,具有更强的目的性和成效性,因而受到更大关注。

1 脂肪酶结构特性及热稳定性影响因素

已知脂肪酶的一级结构虽然同源性差异大,但在空间结构上却高度保守,属于 α/β 水解酶超家族[4]。典型的 α/β 水解酶主要由 8 股 β 折叠片和 6 个 α 螺旋构成。脂肪酶结构与典型 α/β 水解酶结构相比,改变了 β 折叠片和 α 螺旋的大小、数目和位置,但同样具有保守的催化三联体 Ser-Asp-His。如圆弧青霉(*Penicillium cyclopium*)碱性脂肪酶[5],具有 Ser^{132}-Asp^{188}-His^{241} 催化三联体(图 1)。催化三联体中的 Ser 及其周围的氨基酸构成保守的 Gly-X-Ser-X-Gly 结构(X 表示任意氨基酸)。催化三联体处于疏水性的催化口袋底部。催化口袋的口部,往往被一个或多个 α 螺旋的盖子(lid)结构遮盖。在油水界面,当底物三脂酰甘油酯靠近脂肪酶的催化口袋时,盖子结构被诱导打开,底物顺利进入酶活性中心。脂肪酶与底物结合后,底物酯键的羰基碳原子被附近的氧离子洞捕获,酯键随即在活性中心被水解。对脂肪酶热稳定性进行改造时,需注意不能影响催化三联体和氧离子洞,不能影响有盖脂肪酶正常打开盖子结构,否则会影响酶的活性,甚至导致酶的失活。

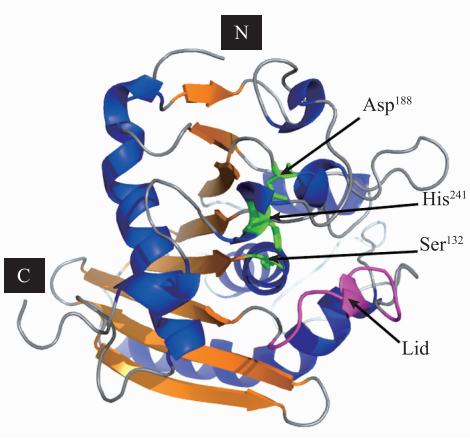


图 1 模拟的圆弧青霉碱性脂肪酶三维结构

Fig. 1 Modeled 3-D structure of Penicillium cyclopium alkaline lipase

影响酶热稳定性的因素有很多,各因素通过影响酶分子的柔性而影响其热稳定性[6]。通过提高分子内作用或增加分子表面与溶剂分子的作用,可降低酶分子的柔性而提高其热稳定性。分子内作用包括:二硫键、氢键、盐桥和疏水作用等。酶分子表面的极性氨基酸残基,增加了酶与溶剂水的作用而提高其热稳定性。脂肪酶分子中的二硫键,氢键和盐桥数目与酶的热稳定性有一定的正相关性。例如,已知的扩展青霉(*Penicillium expansum*)碱性脂肪酶(PDB:3G7N, 最适温度为 34 ℃)[7] 和圆弧青霉(*P. cyclopium*)碱性脂肪酶(最适温度为 25 ℃)[8],热稳定性都低,在 30 ℃以上放置后很快失活。这些酶分子中都有两个二硫键,但与其同源性较高的疏绵状嗜热丝孢菌(*Thermomyces*(*Humicola*) *lanuginosa*)脂肪酶(PDB:1DT3,最适温度为 60 ℃)[9]和米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)脂肪酶(PDB:3TGL,最适温度为 40 ℃)[10]却都具有 3 个二硫键(图 2)和较高热稳定性。

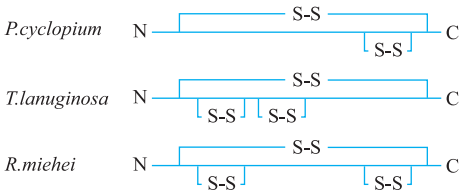


图 2 几种微生物来源脂肪酶中的二硫键

Fig. 2 Disulfide bridges in several microbial lipases

2 热稳定性相关分析软件及酶的热稳定性表示方法

对脂肪酶进行热稳定性改造,往往需要其准确的空间结构。确定酶三维结构的方法有 X 射线衍射(X-ray)法和核磁共振(NMR)法。公开的酶晶体结构可以从 PDB 数据库 (http://www.rcsb.org/pdb)查询。通过美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)搜索“lipase”(脂肪酶)得到的蛋白质序列共有 184 715 条,而在 PDB 数据库能搜索脂肪酶的晶体结构只有 209 种(2014 年 2 月)。随着生物信息学的发展,以一级序列同源性较高酶三维结构为模板的同源建模,也是获得蛋白质三维结构的有效方法。如图 1 即为以一级结构有 99.6%同源性的扩展青霉(*P. expansum*)脂肪酶结构(PDB:3G7N)为模板模拟的圆弧青霉(*P. cyclopium*)碱性脂肪酶三维结构。

通过计算机辅助分析目的脂肪酶待引入的热稳定性因素,针对性更强,效果更明显。随着信息技术的发展,有很多热稳定性相关的分析软件可供使

用。对脂肪酶进行热稳定性改造，常用的相关分析软件或程序名：SWISS-MODEL；ESyPred3D；MODELLER 9.9；SWISS-MODEL；PyMol；Discovery Studio 3.5；NetNGlyc 1.0；NetOGlyc 3.1；DbD 1.20；Discovery Studio 3.5；GROMACS 4.5；B-FITTER；PIC；ccp4-5.0.2；ESBRI；libSVM。

酶的热稳定性高低常用热半失活时间（$t_{1/2}$，半衰期），热半失活温度（T_{50}）或解折叠温度（T_m）来衡量[11-12]。$t_{1/2}$ 是指在一定温度下，酶活性降低到原来的一半时所需时间，即残余 50%酶活性所需时间。T_{50} 指酶在不同温度下放置一定时间后，残余 50%酶活性的温度。常用 T_{50}^{t} 表示在放置 t（min）时间后，残余 50%酶活性的温度。T_m 指酶的结构有一半发生解折叠时的温度。$t_{1/2}$ 和 T_{50} 的计算可用表观残余酶活性测定来完成。检测 T_m 的仪器有差示扫描量热仪（Differential Scanning Calorimetry），圆二色谱仪（Circular Dichroism Spectroscopy），荧光分光光度计（Fluorescence Spectrophotometer）等[13]。T_{50} 和 T_m 虽然在概念上不同，但是酶蛋白结构解折叠的同时，酶活性也逐渐丧失，因此在有的情况下这两个数据可以互相参考。

3 脂肪酶热稳定性改造方法及应用

3.1 定向进化

定向进化指在实验室中模拟自然界的进化过程，将目的基因通过诱变与重组等技术加速改造，并通过特定的选择条件筛选出符合需要的突变子。对于酶热稳定性改造，先基于随机突变、DNA 改组和饱和突变等方法将目的基因改造得突变文库，再结合高温条件筛选出耐热突变子。

3.1.1 基于随机突变 对特定基因进行随机突变，现在主要通过易错 PCR（error-prone PCR，epPCR）来实现。随机突变后，需要高通量筛选大量突变样本才能得到目标突变子。黄瑛等[14]通过易错 PCR 对短小芽胞杆菌（*Bacillus pumilus*）YZ02 脂肪酶基因进行随机突变，酶分子中产生 3 个氨基酸改变（S21P，L124H 和 R112G），突变酶的最适反应温度为 45 ℃（比野生型酶提高 5 ℃），但是热稳定性没有明显变化。Shih 等[15]通过易错 PCR 将土芽孢杆菌（*Geobacillus* sp.）NTU 03 脂肪酶基因突变，产生一个氨基酸改变（E189V），突变脂肪酶的比酶活升高但热稳定性降低。陈彦等[16]通过易错 PCR 对扩展青霉（*P. expansum*）脂肪酶 PEL 基因进行随机突变，获得 T_m 值提高了 3.28 ℃的突变子。该突变子发生两个氨基酸替换（K82R 和 E241P），预测 K82R 在远离活性中心的 α 螺旋处能增加盐桥或氢键，E241P 能在靠近活性中心的 β 折叠处增加刚性，这些都增加了酶分子的热稳定性。总体来说，随机突变需要有效的筛选方法和大量筛选突变样本才能得到理想结果。

3.1.2 基于 DNA 改组 DNA 改组（DNA Shuffling）技术从 1994 年诞生以来，已经应用到很多酶分子的改造中。DNA 改组实现了 DNA 分子的体外重组，是基因在分子水平上的有性重组（Sexual Recombination），主要通过有性 PCR（Sexual PCR）或交错延伸程序（Stagger Extension Process，StEP）实现。DNA 改组需要与之配套的高通量筛选方法。Akbulut 等[17]通过对短小芽胞杆菌（*B. pumilus*）脂肪酶基因的 DNA 改组，在实现改组酶催化活性提高的同时，使其在 50 ℃下的 $t_{1/2}$ 延长到 38.5 min，是原始酶的 9 倍。分析表明，上述改组酶的热稳定性主要源于新替换的氨基酸（G14S，A15G 和 V109S），使其增加了酶分子结构刚性，减小了分子表面的疏水作用。Niu 等[18]通过易错 PCR 和 DNA 改组技术，将少根根霉（*Rhizopus arrhizus*）脂肪酶 RAL 定向进化，获得一个有 3 个氨基酸改变（A9T，E190V 和 M225I）的突变子，其最适温度提高 10 ℃，50 ℃下的 $t_{1/2}$ 延长 12 倍。对原始酶的这 3 个氨基酸位点分别定点突变，结果表明 E190V 对热稳定性的提高起决定作用。第 190 位的 Glu 位于 α 螺旋中，将其突变为疏水性的 Val，有利于稳定 α 螺旋进而有利于整个脂肪酶分子构象的稳定，提高热稳定性。从关于脂肪酶热稳定性改造的报道来看，DNA 改组技术使用频率并不高，可能原因是操作略显繁琐，或是改造效果不理想。

3.1.3 基于饱和突变 饱和突变（Saturation Mutagenesis）即点饱和突变[19]，通过对目的蛋白编码基因的改造，使目的蛋白某个氨基酸被其他 19 种天然氨基酸分别替代。实现方法包括寡核苷酸定向诱变（Oligonucleotide-Directed Mutagenesis），盒式诱变（Cassette Mutagenesis）和基于 PCR 的点饱和突变。虽然饱和突变产生的突变子库（Mutant Library）比随机突变和 DNA 改组要小，但是仍需要使用高通量筛选方法。饱和突变与定点突变相比，它能规

避预测位点所替代氨基酸的不准确性。Shih 等[15]通过实验证明，土芽孢杆菌（*Geobacillus* sp.)NTU 03 脂肪酶第 189 位 Glu 对酶热稳定性影响较大,遂将该氨基酸编码位点进行饱和突变,突变脂肪酶比酶活有升有降,但热稳定性都没有提高。Peng[20]通过 B-FITTER 程序，计算出南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶 B 中 *B* 值(B Factor 或 B Value)较高的氨基酸,然后通过多点饱和突变,产生两个热稳定性比原始酶提高的突变脂肪酶 mCALB7 和 mCALB168,60 ℃下 $t_{1/2}$ 分别是原始酶的 6 倍和 14 倍。同源模拟结果分析表明,mCALB7 中引入 4 个氨基酸改变(P218N,L219K,F220T 和 V221S),进而引入 2 个额外的氢键并改变了 217 位到 224 位之间的结构域。mCALB168 中引入 4 个氨基酸改变(A57T,T89A,G226R 和 R168K)进而引入 3 个额外的氢键。

迭代饱和突变(Iterative Saturation Mutagenesis,ISM)是近年来对饱和突变的新发展。ISM 首先通过计算 B 值,确定饱和突变的位点[21]。*B* 值越大的氨基酸位点,该位点的可变性越大,在多次单点饱和突变后,选择某一个正突变子(热稳定性提高的突变子)为起点,将其它的正突变依次重新用饱和突变方法叠加,最终获得热稳定性大幅提高的多点正突变子。Reetz 等[12,21]利用 ISM，将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)脂肪酶 Lip A 热稳定性大幅提高,最终得到突变子 X(R33A,D34A,K35A,K112C,M134D,Y139C 和 I157M)，其 T5060 提高了 41 ℃,在 55 ℃下的 $t_{1/2}$ 延长了 903 min。Augustyniak 等[22]对上述突变子 X 的热稳定性分子基础研究发现,X 的热力学稳定性(thermodynamic stability)比野生型酶略低,即 X 的刚性并不比野生型酶强。但其动力学稳定性(kinetic stability)增强,在高温下不易产生不可逆的聚集,进而增强了热稳定性。Augustyniak 等[23]用 NMR 方法证实了动力学稳定性增强导致 X 热稳定性增强。迭代饱和突变是现有报道中,对脂肪酶热稳定性改造最成功的方法。Reetz 和 Augustyniak 等对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)脂肪酶 Lip A 热稳定性成功改造，将为其他酶的性质改造提供有益参考。

3.2 定点突变

定点突变是指将目的基因中特定碱基突变,进而将目的蛋白中指定的氨基酸替换产生目的突变子。定点突变需要对目的蛋白空间结构有很清晰的认识。对于脂肪酶的热稳定性进行改造,常要参考热稳定性影响因素并辅以计算机软件分析,在特定位点引入新的氨基酸以引入新的作用力。

3.2.1 引入二硫键 二硫键是影响脂肪酶热稳定性的关键因素之一。对比热稳定性不同的脂肪酶空间结构发现,耐热脂肪酶分子中的二硫键数目普遍多于不耐热的脂肪酶。Yu 等人[24]通过 DbD 软件预测并替换了华根霉(*Rhizopus chinensis*)脂肪酶 RCL 两个氨基酸(F95C 和 F214C),在盖子结构的绞链区(hinge region)引入一个二硫键,突变酶在 60 ℃下 $t_{1/2}$ 延长到原始酶的 7 倍,T_m 增加了 7 ℃。Han 等[25]通过 DbD 软件分析米赫根毛霉(*R. miehei*)脂肪酶中潜在的二硫键,并用 GROMACS 程序预测二硫键引入后脂肪酶的热稳定性。结果显示,两个氨基酸替换(P96C 和 K106C)后引入一个新的二硫键,使突变子在 60 ℃下 $t_{1/2}$ 延长到野生型酶的 5 倍。

3.2.2 引入盐桥 盐桥是在蛋白质分子内通过带正电荷的氨基酸残基(Arg,His 和 Lys)和负电荷的氨基酸残基(Glu 和 Asp)之间相互作用而形成[26]。引入盐桥同样能增强脂肪酶分子的对热稳定性。丁彦蕊等[27]通过分析色杆菌(*Chromobacterium viscosum*)ATCC 6918 脂肪酶的序列和结构 (PDB:1CVL),在活性位点和钙结合位点以外的部分提高 Glu 和 Lys 的含量,降低 A1a、Asp、Thr 和 Gln 的含量,酶分子中盐桥数目明显提高,预测了酶的催化活性不受影响情况下热稳定性将大大提高。近年来通过引入盐桥来提高脂肪酶热稳定性的报道很少,可能是盐桥相对于其他热稳定性因素贡献较小的缘故。

3.2.3 引入氢键 氢键是蛋白质分子内普遍存在的作用力,同样影响着蛋白质分子的热稳定性。通过氨基替换,额外引入新的氢键能增加脂肪酶的热稳定性。孔祥禄等[28]通过分子动力学模拟,分析了南极假丝酵母(*C. Antarctica*)脂肪酶 B 突变子的热稳定性影响因素,发现正突变子中氢键数目增加。蔡少丽等[29]对扩展青霉(*P. expansum*)脂肪酶随机突变体 ep8 基因进行定点突变,ep8 突变子 (K115R)在 40 ℃下保温 30 min,残余 89%酶活性,而同样条件下 ep8 只残余 54%酶活性。分析发现,第 115 位 Lys 位于 α 螺旋处，该位点替换为 Arg 后，由于其 pKa 比 Lys 更高,且具有一个胍基,与周围氨基酸残基形成氢键多出一个,使得突变子热稳定性更高。随后

在 ep8 基础上，该研究组又经过多次单点突变，所获突变子 T_m 最高只提高了 1.21 ℃[30-33]。从现有报道来看，少数氢键的引入，并不能使脂肪酶的热稳定性大幅提高。

3.2.4 分子表面引入极性氨基酸 蛋白质分子溶于水后，倾向于形成球形，表面分布着较多的极性氨基酸，有利于与水分子作用。不同蛋白分子表面的极性氨基酸占全部氨基酸的比例不同，热稳定性强的蛋白分子表面具有更多的极性氨基酸。Santarossa 等[34]定点突变替换莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)脂肪酶 PFL 盖子结构上的氨基酸，突变子（T138N）能提高热稳定性，而突变子(S141G)却相反。在 29 ℃下保温 4 h 后，野生型酶和突变子(T138N)分别保留 50%和 70%酶活性。刘燕雅等[35]对扩展青霉(*P. expansum*)脂肪酶随机突变体 ep8 基因定点突变，突变子(P197E)的 T_m 提高了 2.25 ℃。第 197 位 Pro 位于酶分子表面的无规卷曲部位，突变为 Glu 后改善了酶分子表面亲水性，进而提高热稳定性。

3.2.5 分子内引入疏水氨基酸 蛋白质分子中，极性氨基酸多分布在分子表面，而疏水性氨基酸往往隐藏于分子内部，使分子内部的疏水作用增强。鉴于此，在脂肪酶分子内引入疏水氨基酸，能够在一定程度上提高其热稳定性。Han 等[36]通过对宏基因组 PCR 得到的脂肪酶基因进行定点突变，突变子(S311C)的热稳定性增强，其在 60 ℃下 $t_{1/2}$ 是原酶的 54 倍。分析发现，第 311 位 Ser 位于蛋白质分子表面的 α 螺旋和 β 折叠结合处，靠近于第 316 位的催化氨基酸 Asp，其周围为疏水性氨基酸。替换为 Cys 后，有利于增强第 311 位点的疏水作用。吴厚军等[37]对华根霉(*R. chinensis*)脂肪酶基因进行了定点突变，并提高了该酶热稳定性。突变酶(D190V)在 65 ℃下 $t_{1/2}$ 比野生型酶延长了 1 倍。结构分析表明，该突变氨基酸提高了其所在 α 螺旋内部疏水作用，并产生新的氢键，有利于提高蛋白质热稳定性。Wu 等[38]将土芽孢杆菌(*Geobacillus* sp.)脂肪酶 lipGRD 进行定点突变，突变子(Y224P)的热稳定性提高，65 ℃处理 5 h 后仍能保留 60%的酶活性。

3.2.6 多因素叠加引入 单因素的引入往往对酶的热稳定性影响较小，需要多因素叠加才能使酶热稳定性产生更大的改变。在现有报道中，明确的多因素叠加引入鲜有报道。多因素的叠加引入需要替换多个(连续或散在的)氨基酸。赵伟等[39]通过对 GenBank 录入的嗜热和耐热脂肪酶中单个氨基酸、二肽片段和三肽片段出现的频率统计发现，如单氨基酸 Thr、Pro、Met、Phe、Ser、Tyr 和二肽 KC、EE、KE、RE、VE、YI 等在嗜热脂肪酶中出现的频率高于其在耐热脂肪酶中出现的频率；三肽片段的出现频率和非相邻二元组合的序列偏爱性也显示与蛋白耐热性显著相关。李剑芳等[40]用多元逐步回归法分析发现，与所研究脂肪酶最适温度呈正相关性的氨基酸二联体有 IR，KS，NY，SA，ST 和 YR，多数位于 α 螺旋区，且分布在酶蛋白表面；负相关性的有 DK，DY，IS，KA，WS，YS 和 QI，多数位于 β 折叠区和无规则卷曲区，一般分布于酶蛋白内部，并常出现在多肽链的 N 或 C 端。

通过少数的位点突变很难大幅提高脂肪酶的热稳定性，但是突变点对热稳定性的提高效益是可以叠加的，这在迭代饱和突变中也得到了证实[21]。因此，将易错 PCR 得到的多个单点正突变，通过定点突变或 DNA 改组等过程叠加在一个突变子中，可以使得叠加突变子热稳定性大幅提高。Acharya 等[41]通过易错 PCR 突变枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)脂肪酶基因，得到不同单点突变的 3 个单点正突变子，每个单点突变子的热稳定性有所提高但幅度不大。通过定点突变将 3 个单点突变叠加获得 3 点突变子 TM(N166Y，A132D 和 L114P)。TM 在 55 ℃下 $t_{1/2}$ 是野生型酶的 300 倍。分析表明，这些存在于酶分子的表面的疏水性氨基酸，替换成(相对)极性氨基酸后增加了酶分子的热稳定性。以 TM 基因为模板，Ahmad 等[42]通过两轮易错 PCR 得到 6 个热稳定性略有提高的单点正突变子(A15S，F17S，A20E，N89Y，G111D 和 I157M)，经定点突变叠加获得 9 点突变子 4D3。4D3 与野生型酶相比其 T_m 提高了 15 ℃，热失活率降低了百万倍。结构分析发现，替换后的氨基酸增加了蛋白分子表面的水媒离子网络(water-mediated ionic network)，使热稳定性增强。随后，Ahmad 等[43]重新选择了螺旋(helix)末端和环(loop)连接处的氨基酸位点进行饱和突变，产生 3 个单点正突变(M134E，M137P 和 S163P)，Kamal 等[44]将这 3 个正突变叠加到九点突变子上产生 12 点突变子 6B，T_m 比野生型酶提高了近 22 ℃。与 4D3 相比，6B 中替换加入的氨基酸能够降低蛋白分子表面的疏水区域，能使蛋白质在高温下不聚集进而提

高热稳定性,而高温下的蛋白质聚集是其对热不可逆失活的主要原因。这与 Augustyniak 等[22]对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)脂肪酶高耐热突变子的耐热机理解释是一致的。

4 耐热脂肪酶的高通量筛选方法

4.1 原核表达体系培养法

在原核表达体系中表达改造的脂肪酶基因,优点在于操作简单及筛选和产酶周期短。原核表达体系有很多,但以大肠杆菌最为广泛使用。在所见报道中,用原核表达体系培养法高通量筛选热稳定性改造的脂肪酶一般选择 3 步法:第一步用平板透明圈法初筛;第二步用 96 孔板热稳定性复筛;第三步用扩大培养来确认。Akbulut 等[17]建立了 3 步筛选法筛选短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)改组脂肪酶。第一步,改组基因连接到 pUC19 形成重组质粒并转入 *E. coli* JM109,使用三丁酰甘油酯琼脂平板初筛能产生透明圈、有活性的突变脂肪酶。第二步,用 96 孔板培养突变子,将含酶培养液和 pNPP (p-nitrophenyl palmitate,对硝基苯基软脂酸酯)温浴后在 405 nm 测酶活性,筛选酶活性高于原始酶的转化子。第三步,在摇瓶水平上培养突变子,以 pNPP 为底物测定酶学性质。Ahmad 等[42]也建立了与上述类似的 3 步筛选法。主要区别在于,此方法第二步筛选先用 96 孔板对第一步筛得的阳性突变子进行培养(产酶),再用 96 孔 PCR 板在 PCR 仪上进行热处理,并与未热处理的对比选出热稳定性提高的突变子,用 pNPO(*p*-nitrophenyl oleate,对硝基苯基油酸酯)为底物测定酶学性质。

4.2 真核表达体系培养法

用真核表达体系表达改造的脂肪酶基因,优点在于其具有丰富的表达后加工,且易于酶的生产和分离。对蛋白质结构和功能的研究,酵母是很理想的表达系统。毕赤酵母表达外源基因(B),需要将基因通过特定质粒重组到酵母基因组中(图 3(a)),因此表达的异源基因一般是均一、确定的。对于高通量筛选来说,毕赤酵母似乎难以实现突变基因库的整体转化,因此成功的报道不多。鉴于这样的思考,Yu 等[45]构建了在毕赤酵母中高效表达突变基因库的方法。该方法能够省去把所有基因连接到表达质粒,而后再转化毕赤酵母的麻烦。其要点在于,将突变基因(B),加上与该基因上下游有部分重叠的两个片段(A 和 C,未重叠片段为表达载体的骨架序列),一起转化毕赤酵母,转入酵母的三个片段重组成表达盒后整合入酵母基因组(图 3(b))。产耐热脂肪酶酵母转化子的筛选分两步进行。初筛:将 MD 固体培养基上筛选到的转化子转移到 BMMYA 固体培养基上,诱导产酶后在高温下放置 1 h,在高温处理的培养物上覆盖显色固体培养基(含固蓝 RR (Fast blue RR)和 α 萘乙酸),脂肪酶的存在使培养物周围变成深褐色;复筛:将初筛得、能产较高热稳定性酶的酵母转化子,在 96 孔板上用 BMGY 和 BMMY 依次培养,诱导产酶,再将酶液转入新的 96 孔板,高温(60 或 65℃)处理后用 pNPP 测定酶活性。

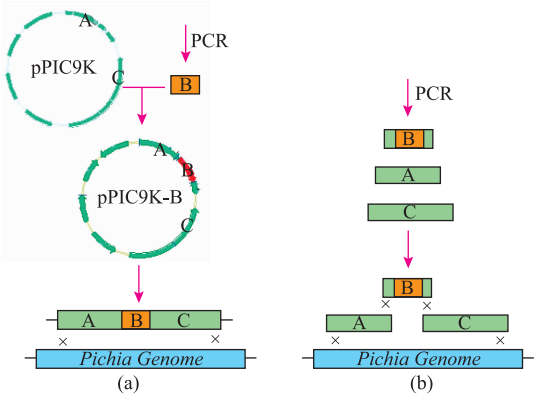


图 3 表达盒在毕赤酵母体外(a)和体内(b)重组

Fig. 3 *In vitro* and *in vivo* recombinants of *Pichia pastoris* expression cassettes

4.3 无细胞培养法

无论是原核表达体系培养法还是真核表达体系培养法,都要将目的基因导入受体细胞才能表达和筛选,对于大量改造基因的筛选,这些过程显然很繁琐。近年来发展的无细胞培养法,不需要将改造基因转化入细胞,直接在无细胞培养液中以改造的基因(连接质粒或不连接质粒)作表达模板,表达的目的酶随即用于检测其目的酶重要酶学性质。对于无细胞培养法表达的脂肪酶,可以直接用显色底物对硝基苯酚酯来检测酶活性、底物选择性和热稳定性等。Park 等[46]用无细胞培养法筛选改造的南极假丝酵母(*C. Antarctica*)脂肪酶 B(CalB),取得了热稳定性提高的突变子。使用 96 孔板进行批量无细胞培养,热处理培养液后,用三丁酰甘油酯为底物检测残余酶活性。初筛得到的优秀改造基因再进一步导入细胞表达,即可以制备足够多的耐热脂肪酶。

4.4 ANS 法

上述三种热稳定性改造脂肪酶的高通量筛选方法都是建立在酶活性测定基础上的，即酶催化酯键水解的基础上，都需要将酶用高温预处理后测定残余酶活性，这些方法能够很直观地判断酶的热稳定性，但是过程并不简便。冯蔚宗等[11]建立了利用 8 – 苯胺基 –1 – 萘磺酸（8 –Anilino –1 – naphthalenesulfonic acid，ANS）作为荧光探针来高通量测定脂肪酶热稳定性的方法，即 ANS 法。ANS 作为一种性质稳定的荧光探针，能紧密结合蛋白质的疏水基团，在 378 nm 紫外光激发下能发出强烈的荧光。未变性酶蛋白的疏水基团一般包裹在分子内部，遇到 ANS 后仅发出微弱的荧光；热变性酶蛋白的疏水基团暴露，遇到 ANS 后能发出强烈的荧光，荧光强度与酶蛋白的热变性程度呈正相关[47–48]。该方法是测定脂肪酶的 T_m 值，与传统的 NaOH 滴定和平板透明圈法的测定结果相似，并可在 96 孔板上快速完成数十个样品的 T_m 测定，适用于高通量测定脂肪酶热稳定性。

5 展 望

脂肪酶在热稳定性方面的改造应用了多种手段，已经取得了大量成果。对于脂肪酶的热稳定性研究报道几乎都是基于脂肪酶的水解活性的，脂肪酶还可以用于生物柴油的转化等，在有机溶剂下的热稳定性改造却鲜有报道。大量的定点突变结果似乎没有定向进化的好，因此要通过定点突变来大幅提高脂肪酶的热稳定性，还需要有更准确的预测。定向进化改造脂肪酶的热稳定性能够得到满意的结果，但是定向进化要基于高通量筛选，这就需要更简单便捷的筛选方法。如将无细胞培养法和 ANS 法相结合，形成新的高通量筛选方法，可使得筛选步骤进一步简化。

参考文献：

[1] Jaeger K E，Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. **Curr Opin Biotechnol**，2002，13：390–397.
[2] Hasan F，Shah A A，Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. **Enzyme Microb Technol**，2006，39：235–251.
[3] Eijsink V G，Gaseidnes S，Borchert T V，et al. Directed evolution of enzyme stability[J]. **Biomol Eng**，2005，22：21–30.
[4] Nardini M，Dijkstra B W. Alpha/beta–hydrolase fold enzymes：the family keeps growing[J]. **Curr Opin Struct Biol**，1999，9：732–737.
[5] 张慧敏，李剑芳，邬敏辰. 圆弧青霉脂肪酶基因序列的生物信息学分析[J]. 食品与生物技术学报，2010，29：602–608.
ZHANG Huimin，LI Jianfang，WU Minchen. Bioinformatics analysis on the sequence of lipase gene from *Penicillium cyclopium* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2010，29：602–608.（in Chinese）
[6] Feller G，Narinx E，Arpigny J L，et al. Enzymes from psychrophilic organisms[J]. **FEMS Microbiol Rev**，1996，18：189–202.
[7] 袁彩，林琳，施巧琴，等. 扩展青霉碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达[J]. 生物工程学报，2003，19：231–235.
YUAN Cai，LIN Lin，SHI Qiaoqin，et al. Overexpression of *Penicillium expansum* lipase gene in *Pichia pastoris* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**，2003，19：231–235.（in Chinese）
[8] TAN Z，LI J，WU M，et al. High–level heterologous expression of an alkaline lipase gene from *Penicillium cyclopium* PG37 in *Pichia pastoris*[J]. **World J Microbiol Biotechnol**，2011，27：2767–2774.
[9] 郑艳，周波，宋宁宁，等. 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 菌物学报，2009，28：268–274.
ZHENG Yan，ZHOU Bo，SONG Ningning，et al. Cloning of a gene encoding lipase from *Thermomyces lanuginosus* and effective expression of the gene in *Pichia pastoris*[J]. **Mycosystema**，2009，28：268–274.
[10] 徐苏炜，林影，韩振林，等. 米黑根毛霉脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达[J]. 食品与发酵工业，2008，34：10–14.
XU Suwei，LIN Ying，HAN Zhenlin，et al. High level expression of *Rhizomucor miehe*i lipase gene in *Pichia pastoris* [J]. **Food and Fermentation Industries**，2008，34：10–14.（in Chinese）
[11] 冯蔚宗，林俊涵，菜少丽，等. 高通量脂肪酶稳定性测定法–ANS 法的建立[J]. 生物工程学报，2011，27：584–591.
FENG Weizong，LIN Junhan，CAI Shaoli，et al. Rapid and high throughput measurement of lipase thermo–stability through ANS fluorescence signal assay[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**，2011，27：584–591.（in Chinese）

[12] Reetz M T,Carballeira J D,Vogel A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability[J]. **Angew Chem Int Ed Engl**,2006,45:7745-7751.

[13] Kamal M Z,Ahmad S,Yedavalli P,et al. Stability curves of laboratory evolved thermostable mutants of a *Bacillus subtilis* lipase [J]. **Biochim Biophys Acta**,2010,1804:1850-1856.

[14] 黄瑛, 蔡勇, 杨江科, 等. 基于易错 PCR 技术的短小芽孢杆菌 YZ02 脂肪酶基因 BpL 的定向进化 [J]. 生物工程学报, 2008,24:445-451.
HUANG Ying,CAI Yong,YANG Jiangke,et al. Directed evolution of lipase of *Bacillus pumilus* YZ02 by error-prone PCR[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**,2008,24:445-451.(in Chinese)

[15] Shih T W,Pan T M. Substitution of Asp189 residue alters the activity and thermostability of *Geobacillus* sp. NTU 03 lipase[J]. **Biotechnol Lett**,2011,33:1841-1846.

[16] 陈彦,司圣乾,刘燕雅,等. 易错 PCR 对扩展青霉脂肪酶基因 PEL 的定向进化[J]. 安徽农学通报,2011,17:22-24.

[17] Akbulut N,Tuzlakoglu Oztürk M,Pijning T,et al. Improved activity and thermostability of *Bacillus pumilus* lipase by directed evolution[J]. **J Biotechnol**,2013,164:123-129.

[18] NIU W N,LI Z P,ZHANG D W,et al. Improved thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus arrhizus* lipase by directed evolution[J]. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**,2006,43:33-39.

[19] 陶苏丹,刘佳,陈喜文,等. 点饱和突变技术及其在蛋白质工程中的应用[J]. 中国生物工程杂志,2007,27:82-86.
TAO Sudan,LIU Jia,CHEN Xiwen,et al. Site-saturation mutagenesis technology and its application in protein engineering[J]. **China Biotechnology**,2007,27:82-86.(in Chinese)

[20] PENG X Q. Improved thermostability of lipase B from *Candida antarctica* by directed evolution and display on yeast surface[J]. **Appl Biochem Biotechnol**,2013,169:351-358.

[21] Reetz M T,Carballeira J D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes [J]. **Nat Protoc**,2007,2:891-903.

[22] Augustyniak W,Brzezinska A A,Pijning T,et al. Biophysical characterization of mutants of *Bacillus subtilis* lipase evolved for thermostability:factors contributing to increased activity retention[J]. **Protein Sci**,2012,21:487-497.

[23] Augustyniak W,Wienk H,Boelens R,et al. ^{1}H,^{13}C and ^{15}N resonance assignments of wild-type *Bacillus subtilis* Lipase A and its mutant evolved towards thermostability[J]. **Biomol NMR Assign**,2013,7:249-252.

[24] Yu X W,Tan N J,Xiao R,et al. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase:increased thermostability and altered acyl chain length specificity[J]. **PLoS One**,2012,7:e46388.

[25] Han Z L,Han S Y,Zheng S P,et al. Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**,2009,85:117-126.

[26] Costantini S,Colonna G,Facchiano A M. ESBRI:a web server for evaluating salt bridges in proteins[J]. **Bioinformation**,2008,3:137-138.

[27] 丁彦蕊,蔡宇杰,须文波. 用同源建模法探索提高脂肪酶的耐热性[J]. 计算机与应用化学,2007,24:1535-1538.
DIN Yanrui,CAI Yujie,XU Wenbo. The research on improving the lipase thermostability by homology modeling [J]. **Computers and Applied Chemistry**,2007,24:1535-1538.(in Chinese)

[28] 孔祥禄,郑穗平,苏国栋,等. 生物信息学在脂肪酶热稳定性评价中的应用[J]. 山西大学学报:自然科学版,2009,32:113-116.
KONG Xianglu,ZHENG Suiping,SU Guodong,et al. Application of bioinformatics in evaluating the thermostability of CALB[J]. **Journal of Shanxi University:Nat Sci Ed**,2009,32:113-116.(in Chinese)

[29] 蔡少丽,邹有土,黄建忠,等. 定点突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善[J]. 应用与环境生物学报,2013,19:43-47.
CAI Shaoli,ZOU Youtu,HUANG Jianzhong,et al. Improvement of thermostability of *Penicillium expansum* lipase by site-directed mutagenesis[J]. **Chinese Journal of Applied Environmental Biology**,2013,19:43-47.(in Chinese)

[30] 沈麟,施文芳,胡长浩,等. 扩展青霉脂肪酶 K56R 叠加突变对热稳定性的影响[J]. 生物技术,2009,19:23-26.
SHEN Lin,SHI Wenfang,HU Changhao,et al. K56R double-mutagenesis effected thermostability of *Penicillium expansum* lipase[J]. **Biotechnology**,2009,19:23-26.(in Chinese)

[31] 蔡少丽,林俊涵,王彩梅,等. K55R 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善[J]. 生物工程学报,2007,23:677-

680.
CAI Shaoli，LIN Junhan，WANG Caimei，et al. Improvement of the thermostability of *Penicillium expansum* lipase by mutagenesis the random mutant ep8 at K55R[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**，2007，23：677–680.（in Chinese）
[32] 邹有土，吴义真，施文芳，等. K202A 突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的影响[J]. 中国生物工程杂志，2007，27：52–56.
ZOU Youtu，WU Yizhen，SHI Wenfang，et al. Effect of K202A mutation in the thermostability of *Penicillum expansum* lipase[J]. **China Biotechnology**，2007，27：52–56.（in Chinese）
[33] 王彩梅，蔡少丽，吴义真，等. 扩展青霉脂肪酶 ep8 与 R182K 叠加突变体的构建[J]. 生物技术通报，2007，4：165–168.
WANG Caimei，CAI Shaoli，WU Yizhen，et al. R182K double–mutagenesis of *Penicillium expansum* lipase [J]. **Biotechnology Bulletin**，2007，4：165–168.（in Chinese）
[34] Santarossa G，Lafranconi P G，Alquati C，et al. Mutations in the “lid” region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragi* lipase[J]. **FEBS Lett**，2005，579：2383–2386.
[35] 刘燕雅，黄平，司圣乾，等. P197E 与 ep8 叠加突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的影响[J]. 微生物学通报，2010，37：161–165.
LIU Yanya，HUANG Ping，SI Shengqian，et al. Improving of the thermostability of *Penicillium expansum* lipase by creating mutation P197E[J]. **Microbiology China**，2010，37：161–165.（in Chinese）
[36] Kumar R，Sharma M，Singh R，et al. Characterization and evolution of a metagenome–derived lipase towards enhanced enzyme activity and thermostability[J]. **Mol Cell Biochem**，2013，373：149–159.
[37] 吴厚军，喻晓蔚，沙冲，等. D190V 点突变提高华根霉 Rhizopus chinensis CCTCC M201021 脂肪酶的最适温度和热稳定性[J]. 微生物学通报，2013，40：1955–1961.
WU Houjun，YU Xiaowei，SHA Chong，et al. Improved optimum temperature and thermostability of the lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 by site–directed mutagenesis of D190V[J]. **Microbiol China**，2013，40：1955–1961.（in Chinese）
[38] WU L，LIU B，HONG Y，et al. Residue Tyr224 is critical for the thermostability of *Geobacillus* sp. RD–2 lipase [J]. **Biotechnol Lett**，2010，32：107–112.
[39] 赵伟，许尤厚，郑甲，等. 基于支持向量机的脂肪酶耐热序列与嗜热序列分类研究[J]. 中南大学学报：自然科学版，2011，42：2543–2550.
ZHAO Wei，XU Youhou，ZHENG Jia，et al. Classification of thermostable and thermophilic lipases using support vector machines [J]. **Journal of Central South University：Science and Technology**，2011，42：2543–2550.（in Chinese）
[40] 李剑芳，张慧敏，邬敏辰. 脂肪酶氨基酸及其二联体与最适温度的相关性分析[J]. 食品与生物技术学报，2011，30：801–805.
LI Jianfang，ZHANG Huimin，WU Minchen. The relationship between amino acid and its dipeptide with the optimum temperature in lipase[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**，2011，30：801–805.（in Chinese）
[41] Acharya P，Rajakumara E，Sankaranarayanan R，et al. Structural basis of selection and thermostability of laboratory evolved *Bacillus subtilis* lipase[J]. **J Mol Biol**，2004，341：1271–1281.
[43] Ahmad S，Rao N M. Thermally denatured state determines refolding in lipase：mutational analysis [J]. **Protein Sci**，2009，18：1183–1196.
[44] Kamal M Z，Ahmad S，Molugu T R，et al. In vitro evolved non–aggregating and thermostable lipase：structural and thermodynamic investigation[J]. **J Mol Biol**，2011，413：726–741.
[42] Ahmad S，Kamal M Z，Sankaranarayanan R，et al. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases：in vitro evolution and structural insight [J]. **J Mol Biol**，2008，381：324–340.
[45] YU X W，WANG R，ZHANG M，et al. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by in vivo recombination in *Pichia pastoris*[J]. **Microb Cell Fact**，2012，11：102.
[46] Park C G，Kwon M A，Song J K，et al. Cell–free synthesis and multifold screening of *Candida antarctica* lipase B （CalB） variants after combinatorial mutagenesis of hot spots[J]. **Biotechnol Prog**，2011，27：47–53.
[47] Yadav J K，Prakash V. Thermal stability of α–amylase in aqueous cosolvent systems[J]. **J Biosci**，2009，34：377–387.
[48] Lavinder J J，Hari S B，Sullivan B J，et al. High–throughput thermal scanning：a general，rapid dye–binding thermal shift screen for protein engineering[J]. **J Am Chem Soc**，2009，131：3794–3795.