

通过改造底物结合区氨基酸疏水性提高 氨肽酶热稳定性

ULIHO Alphonse^{1,2}, 杨套伟^{1,2}, 苑曼曼^{1,2}, 徐美娟^{1,2}, 张显^{1,2},
MUGISHA Samson^{1,2}, 周俊平^{1,2}, 饶志明^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 21412)

摘要: 通过提高枯草芽孢杆菌来源的氨肽酶底物结合区域氨基酸的疏水性, 提高氨肽酶 YwaD 的热稳定性。基于氨肽酶底物结合区域氨基酸特性分析, 选定亲水性氨基酸残基 N385 为目标, 通过定点突变使其突变为疏水氨基酸残基 L385, 获得突变体 N385L。结果表明, 与野生型 ywaD 相比, 突变体 N385L 酶热稳定性明显提高, 在 80 °C 放置 30 min, 野生型 YwaD 完全失活, 而突变体 N385L 仍保留 20% 的酶活力。另外, 突变型 N385L 对底物氨基酰基-硝基苯胺的亲合力提高了 47.4%, 催化效率提高了 28.5%。该研究有利于提高氨基肽酶工业应用前景。

关键词: 氨肽酶; 定点突变; 疏水性; 热稳定性

中图分类号: Q 789 文章编号: 1673-1689(2020)03-0009-07 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.03.002

Enhancing Thermostability of Aminopeptidase by Improving the Hydrophobic Interactions in the Substrate Binding Region

ULIHO Alphonse^{1,2}, YANG Taowei^{1,2}, YUAN Manman^{1,2}, XU Meijuan^{1,2}, ZHANG Xian^{1,2},
MUGISHA Samson^{1,2}, ZHOU Junping^{1,2}, RAO Zhiming^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The increase of thermostability of aminopeptidase by creating hydrophobic interactions in the substrate binding region was exploited in *Bacillus subtilis* 168. The hydrophilic residue N385 was targeted and substituted by hydrophobic residue L385. Based on thermostability analysis, N385L mutant was found to retain 20% while the relative activity of the wild type was reduced to 0% at the same temperature (80 °C) in 30 min. Furthermore, the affinity and catalytic efficiency of the mutant N385L for the substrate of L-Leu-pNA increased by 47.4% and 28.5%, respectively, compared to wild

收稿日期: 2018-03-28

基金项目: 江苏省杰出青年科学基金项目(BK20150002); 国家自然科学基金项目(21778024); 江苏省自然科学基金项目(BK20161292); 中国博士后科学基金项目(2017M620189); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(1012050205181860, JUSRP51708A); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省现代发酵工业协同创新中心项目。

* 通信作者: 饶志明(1975—), 男, 农学博士, 教授, 主要从事发酵工程方面研究。E-mail: raozhm@jiangnan.edu.cn

Keywords: aminopeptidase, site-directed mutagenesis, hydrophobic interactions, thermostability

10 JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY Vol.39 Issue 3 2020

以 *B. subtilis* 168 染色体 DNA 为模板,利用引物对 ywaD-F/ywaD-R,通过聚合酶链式反应(PCR)扩增获得 ywaD 基因。将 PCR 产物经纯化后,与表达载体质粒 pMA5 连接,获得重组质粒 pMA5-ywaD,按照文献^[11]报道的方法,将经过测序验证正确的重组质粒 pMA5-ywaD 转化到 *B. subtilis* 168 中,获得重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-ywaD。

利用引物对 ywaD-F (N385L)/ywaD-R(N385L),以 pMA5-ywD 为模板,并使用高保真 DNA 聚合酶,通过 PCR 扩增将所需的突变 N385L 插入到 ywaD 基因中获得突变基因。将纯化后 PCR 产物用 exnaseII 酶在 37 °C 处理 30 min 后,用 Dpn I 酶消化完全甲基化和未突变的亲代 DNA 1 h 以提高突变效率^[12]。将得到的质粒经进一步测序验证,以确保突变成功。然后将突变正确的重组质粒 pMA5-N385L 转化到枯草芽孢杆菌 168 中,获得重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-N385L。

1.3 菌株培养及氨肽酶的制备

发酵培养基:23.6 g/L 酵母提取物、11.6 g/L 胰蛋白胨、9.4 g/L K_2HPO_4 、2.2 g/L KH_2PO_4 、4 ml/L 甘油、0.6 mmol/L Co^{2+} 和 50 μ g/mL 卡那霉素,调节 pH 至 pH(7.2±0.2)。重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-ywaD 和 *B. subtilis* 168/pMA5-N385L 分别在 37 °C、180 r/min 培养 36 h,然后 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集发酵液上清液,收集的上清液即为氨肽酶粗酶液。

将体积分数 60% 的无水乙醇加入到上述氨肽酶粗酶液进行酶液浓缩,然后 4 °C、10 000 r/min 离心 20 min 收集样品沉淀。接着,将样品沉淀重悬于 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中进行透析,每 12 h 后更新一次缓冲液,透析 48 h。随后,将用 4.5 μ m 滤膜过滤后的样品加入到装有 DEAE-Sepharose Fast Flow 柱(GE Healthcare, USA) Ni^{2+} -NTA(次氨基三乙酸酯)AKTA 纯系统中,用阴离子交换柱进行分离纯化(流速 0.5 mL/min, 结合缓冲液:0.02 mol/L Tris-HCl buffer, 0.5 mol/L NaCl, pH 7.4)。粗酶液吸附至 1 mL HisTrap™ HP 纯化柱上后,用剂量 1 mL 咪唑进行梯度(0~500 mmol/L)洗脱。最后,通过 SDS-PAGE 分析纯化后酶的纯度^[13]。根据 Bradford 方法进行蛋白质浓度测定^[14]。

1.4 酶活测定

根据文献^[15-19]报道的氨肽酶测定方法略微进行了改进,用于检测突变型 N385L 和野生型氨肽酶

YwaD 酶活。1.5 mL 反应体系:50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5),适量的纯化酶,4 mmol/L 的 L-亮氨酸-对硝基苯胺(L-Leu-pNA)底物,40 °C 反应 10 min,随后加入 1.5 mL 无水乙醇终止反应。在 405 nm 处测量吸光值。氨肽酶酶活定义:1 min 释放 1 μ mol/L 对硝基苯胺所需的酶量为一个单位(U)。用 Bradford 法测定样品中蛋白质含量^[14]。所有实验均独立重复 3 次。

1.5 氨肽酶酶学特性表征

1.5.1 温度和 pH 对酶活性和稳定性的影响 将纯化后的野生型和突变体氨肽酶分别置于 20~80 °C 环境中,考察其最适反应温度和热稳定性。在 pH 6.0~11.0 范围内考察其最适 pH,使用 50 mmol/L 的不同缓冲液:磷酸盐缓冲液(pH 6.5~7.5),Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0~9.0),碳酸盐缓冲液(pH 9.5~11.0)。所有实验均独立重复 3 次。

1.5.2 金属离子氨肽酶活性的影响 在含有 0.1 mmol/L 或 1 mmol/L Ca^{2+} ($CaCl_2$), Mg^{2+} ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Mn^{2+} ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), Cu^{2+} ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$), Ni^{2+} ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$), Co^{2+} ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$), Zn^{2+} ($ZnCl_2$) 的 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中测定二价金属离子对氨肽酶的影响。为了检测抑制剂/螯合剂对氨肽酶的影响,使用了以下抑制剂:PMSF、卡巴明、EDTA、SDS 和 Bestatin。对照组采用纯酶与 50 mmol/L (pH 8.5) 的 Tris-HCl 缓冲液混合而不添加任何离子或抑制剂。所有实验均独立重复 3 次。

1.5.3 动力学参数测定 在不同底物浓度(0.5~5 mmol/L)下测定动力学参数,例如 K_m 、 K_{cat} 和 K_{cat}/K_m 。使用 Lineweaver-Burk 曲线来估计 K_m 和 V_{max} ,该曲线符合 Michaelis-Menten 方程^[17,20]。所有实验均独立重复 3 次。

1.6 结构分析

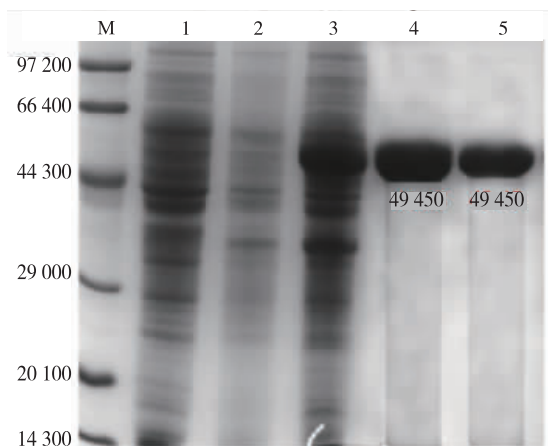
将 ywaD 基因序列(Gene bank:AGA22702.1.1)提交到蛋白质结构模型数据库(<https://www.swissmodel.expasy.org>)所生产的 PDB(蛋白质数据库)结构作为比较模型。相关结果采用软件 Studio software 2.5 进行分析。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质和结构分析的比较同源性

根据网站 <https://www.swissmodel.expasy.org> 生成的 *B. subtilis* 168 来源的氨肽酶 PDB 3D 结构和

软件 Studio software 2.5 分析,我们初步选择了底物结合区的 6 个氨基酸残基 (ASN338、ASN385、GLY389、PHE386、PHR366 和 THR393) 作为突变对



M. 蛋白质 Marker;1. *B. subtilis* 168/pMA5-ywaD 发酵上清液;2. *B. subtilis* 168/pMA5 发酵上清液;3. *B. subtilis* 168/pMA5-N385L 发酵上清液;4. YwaD 纯化蛋白质;5. N385L 纯化蛋白质

图 1 SDS-PAGE 分析氨肽酶及突变体 N385L

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified wild-type YwaD and its mutant N385L

表2 氨基肽酶及其突变体 N385L 动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the purified wild-type YwaD and its mutant N385L

氨基肽酶	K_{cat}/s^{-1}	$K_m/(mmol/L)$	$K_{cat}/K_m/(mmol/L/s)$
WT	68.6 ± 2.3	2.8 ± 0.3	22.8
N385L	55.7 ± 0.8	1.9 ± 0.1	29.3

2.3 氨肽酶酶学特性表征

2.3.1 温度对重组氨肽酶的影响 由图 2(a)可知, N385L 位点的突变对氨肽酶的最适催化温度没有影响,突变前后最适温度均为 40 °C,这与枯草芽孢杆菌 Zj016 来源的氨肽酶最适温度(55 °C)不同^[10,21]。较低的最适反应温度在工业生产过程中更具有优势,因为其需要更少的热量。

由图 2(b)可知,N385L 位点的突变能够提高氨肽酶的热稳定性,在 80 °C 放置 30 min 时,野生型 YwaD 完全失活,而突变体 N385L 仍保留 20% 的酶活力。另外,在最适催化温度(40 °C)下温育 36 h,突变体 N385L 能够保持 80% 以上活力,而野生型 YwaD 在相同条件下仅保留 60% 的活力。这种热稳定性的增加,是由底物结合区域中的 L385 取代亲水性残基 N385 引起的。该疏水性残基 L385 代替 N385 直接与底物接触,增加了底物与氨肽酶 YwaD

象,根据初步实验结果,发现 N385 残基突变为疏水性残基 L385 时,氨肽酶酶活和热稳定性较好。

根据 SDS-PAGE 分析,野生型氨肽酶和突变体 N385L 分别成功在枯草芽孢中过量表达,氨肽酶相对分子质量大小为 49 450 (图 1)。重组菌株 *B. subtilis* 168/pMA5-ywaD 与 *B. subtilis* 168/pMA5-N385L 发酵液中氨肽酶酶活基本一致,为 50.96 U/mL 左右。这与枯草芽孢杆菌 Zj016 来源的氨肽酶在 *B. subtilis* 168 过表达的酶活力((52 ± 1.9) U/mL)基本一致,可能原因是采用了相同的信号肽^[21]。而野生型 YwaD 和突变体 N385L 的比活力分别为 134.3 U/mg 和 129.6 U/mg,即 N385 位点突变对其比活力略有影响。

2.2 动力学参数分析

参照材料和方法部分所述方法测定 K_{cat} 、 K_m 和催化效率(K_{cat}/K_m)。如表 2 所示,与野生型相比,突变型 N385L 对底物的亲和力提高了 47.4%,催化效率提高了 28.5%。其主要原因可能是,突变体底物结合区域中的疏水相互作用的提高使酶和底物结合更紧密。

的疏水相互作用。显然,增强的疏水性相互作用更稳定了过渡态,使酶具有更好的稳定性。另外,疏水性相互作用的存在缩短了底物与酶之间的距离,并使它们接触更紧密,提高了酶的稳定性。Gao 等通过序列分析发现在氨肽酶非催化区域含有一段热敏域,通过删除该热敏域片段,氨肽酶在 30min 内半衰期从 71 °C 提高至 77 °C^[1]。

2.3.2 pH 对重组氨肽酶的影响 如图 3(a)所示,突变体 N385L 在碱性 pH(pH 8~9)范围中显示出良好的活性,最适 pH 为 8.5,这之前报道的其他氨肽酶相一致^[16,22-25]。随后考察了酶的 pH 稳定性(图 3(b)),当低于最适 pH 8.5 时,突变体 N385L 的活力随着反应时间的延长而增加(12 h 内),但高于最适 pH 8.5 时,突变体 N385L 的活力随着反应时间的延长而轻微降低。显然,突变型氨肽酶 N385L 可以长时间在最佳 pH 下工作。

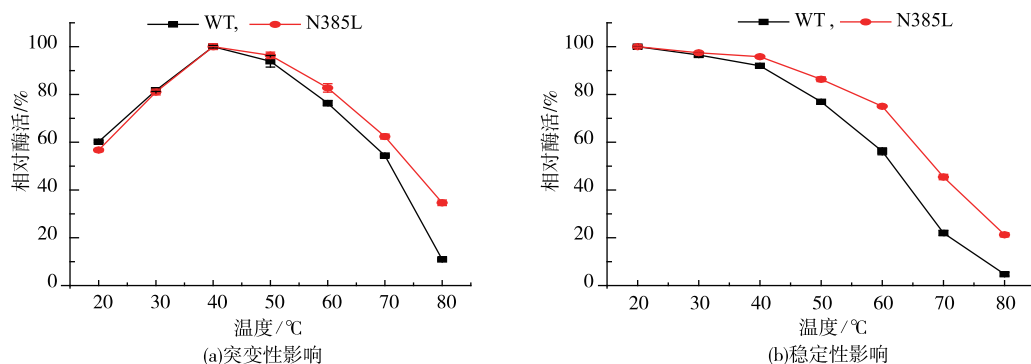


图 2 温度对突变体 N385L 活性和稳定性的影响

Fig. 2 Temperature effect on the activity and stability of mutant N385L

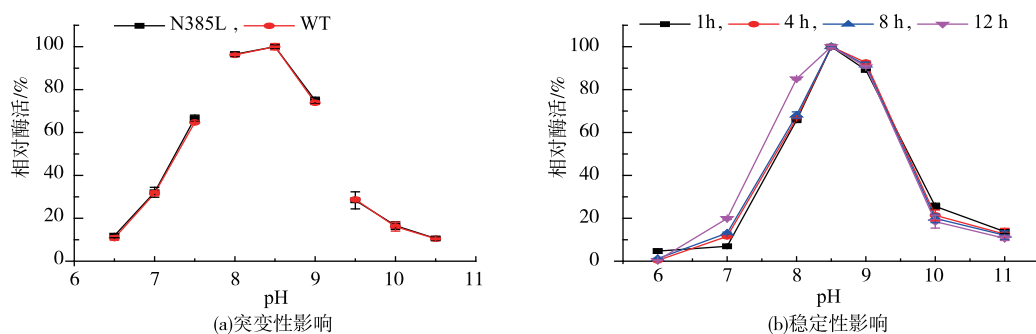


图 3 pH 对突变体 N385L 活性和稳定性的影响

Fig. 3 pH effect on the activity and stability of mutant N385L

2.3.3 金属离子对重组氨肽酶的影响 添加 0.1 mmol/L 金属离子时, 野生型酶和突变体 N385L 被 Co^{2+} 离子激活, 且突变体 N385L 被高度激活 (192.2%), 证实该氨肽酶是金属氨肽酶。金属离子对野生型和突变体 N385L 表现了抑制作用均为:

$\text{Mn}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$, 高浓度的金属离子对氨肽酶抑制性加强(表 3)。这些现象与之前的研究报道一致, 不稳定的锌离子可被钴离子取代可以增强酶的稳定性^[19,26]。

表 3 离子对重组氨肽酶 N385L 突变体的影响

Table 3 Effect of metal ions on the activity of mutant N385L

金属离子	相对活性/%			
	突变体 N385L		野生型	
	0.1 mmol/L	1 mmol/L	0.1 mmol/L	1 mmol/L
None	100	100	100	100
Co^{2+}	192.2±0.6	114.71±1.7	188.0±1.4	116.2±0.25
Zn^{2+}	40.76±1.6	11.83±0.8	39.7±0.6	13.1±0.7
Ca^{2+}	76.02±0.7	34.29±2.0	75.9±1.2	34.7±1.3
Mg^{2+}	81.98±1.4	49.30±0.7	84.3±0.8	45.3±0.6
Mn^{2+}	96.82±1.5	23.0±0.6	95.1±1.4	31.5±1.0
Cu^{2+}	80.21±1.8	60.90±0.9	77.6±1.0	62.7±1.4
Ni^{2+}	45.9±1.8	23.2±0.7	45.3±0.5	22.3±0.6

3 结 语

氨肽酶因具有广泛的底物谱使其在药物和食品工业等多种领域得到广泛应用^[27],本研究中基于氨肽酶底物结合区域氨基酸特性分析,将枯草芽孢

杆菌来源氨肽酶第 385 位亲水性氨基酸残基 N 突变为疏水氨基酸残基 L,突变体 N385L 稳定性、对底物氨基酰基-硝基苯胺的亲合力和催化效率得到明显提高。因此,本研究中获得的具有良好工业属性的氨肽酶将具有更好的工业应用前景。

参考文献:

- [1] GAO X, LIU Z, CUI W, et al. Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region[J]. **PLoS One**, 2014, 9: e92357.
- [2] NANDAN A, NAMPOOTHIRI K M. Molecular advances in microbial aminopeptidases[J]. **Bioresource Technology**, 2017, 245: 1757-1765.
- [3] WU B, SHI P, LI J, et al. A new aminopeptidase from the keratin-degrading strain *Streptomyces fradiae* var. K11[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2010, 160: 730-739.
- [4] SONODA H, DAIMON K, YAMAJI H, et al. Efficient production of active *Vibrio proteolyticus* aminopeptidase in *Escherichia coli* by co-expression with engineered vibriolysin[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009, 4: 191-198.
- [5] MARAS B, GREENBLATT H M, SHOHAM G, et al. Aminopeptidase from *Streptomyces griseus*-primary structure and comparison with other zinc-containing aminopeptidases[J]. **European Journal of Biochemistry**, 1996, 236: 843-846.
- [6] LEI F, ZHAO Q, SUN Waterhouse D, et al. Characterization of a salt-tolerant aminopeptidase from marine *Bacillus licheniformis* swjs33 that improves hydrolysis and debittering efficiency for soy protein isolate[J]. **Food Chemistry**, 2017, 214: 347-353.
- [7] ARIMA J, UESUGI Y, IWABUCHI M, et al. Change in substrate preference of *Streptomyces* aminopeptidase through modification of the environment around the substrate binding site[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72: 7962-7967.
- [8] ZHANG K, SU L, DUAN X, et al. High-level extracellular protein production in *Bacillus subtilis* using an optimized dual-promoter expression system[J]. **Microbial Cell Factories**, 2017, 16 (32): 1-15(15).
- [9] ABDELATIF L F, COLETTE B J, FABRICE B, et al. The dppa gene of *Bacillus subtilis* encodes a new d-aminopeptidase[J]. **Molecular Microbiology**, 2000, 38 (3): 504-513
- [10] GAO X, CUI W, TIAN Y, et al. Over-expression, secretion, biochemical characterisation, and structure analysis of *Bacillus subtilis* aminopeptidase[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2013, 93: 2810-2815.
- [11] SPIZIZEN C. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. **Journal of Bacteriology**, 1960, 81: 741-746.
- [12] LI F, MULLINS J I. Site-directed mutagenesis facilitated by DpnI selection on hemimethylated DNA[J]. **In Vitro Mutagenesis Protocols**, 2002, 182 (3): 19-27.
- [13] LAEMMLI K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**, 1970, 227: 680- 685.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72: 248-254.
- [15] KUO LY, HWANG G Y, LAI Y J, et al. Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase ii of *Bacillus stearothermophilus*[J]. **Current Microbiology**, 2003, 47: 40-45.
- [16] SIEW M L, SUN T T, SAVITHIRI D P. Enzymatic and molecular characterisation of leucine aminopeptidase of *Burkholderia pseudomallei*[J]. **BMC Microbiology**, 2013, 13: 110.
- [17] CHI M C, HUANG H B, LIU J S, et al. Residues threonine 346 and leucine 352 are critical for the proper function of *Bacillus kaustophilus* leucine aminopeptidase. **FEMS Microbiology Letter**, 2006, 260: 156-161.
- [18] SHEN Y, WANG F, LAN D, et al. Biochemical properties and potential applications of recombinant leucine aminopeptidase from *Bacillus kaustophilus* CCRC 11223[J]. **International Journal of Molecular Sciences**, 2011, 12: 7609-7625.
- [19] REILAND V, FUNDOIANO-HERSHCOVITZ Y, GOLAN G, et al. Preliminary crystallographic characterization of bsap, an extracellular aminopeptidase from *Bacillus subtilis*[J]. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, 2004, 60: 2371-2376.

- [20] HIDEKO T R, KYOKO Y, SHIHO K, et al. Characterization of a recombinant soluble form of human placental leucine aminopeptidase/oxytocinase expressed in Chinese hamster ovary cells[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2000, 267 (1): 46-52.
- [21] TANG W, LI Z, LI C, et al. High-level expression and characterization of the *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* str. Bsp1 ywad aminopeptidase in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expression and Purification**, 2016, 122: 23-30.
- [22] LEE G D, CHUN S S, KHO Y H, et al. Purification and properties of an extracellular leucine aminopeptidase from the *Bacillus* sp. N2[J]. **Journal of Applied Microbiology**, 1998, 85(3): 561-566.
- [23] DONG L, CHENG N, WANG M W, et al. The leucyl aminopeptidase from *Helicobacter pylori* is an allosteric enzyme[J]. **Microbiology**, 2005, 151: 2017-2023.
- [24] YE X J, NG T B. Purification and characterisation of an alanine aminopeptidase from bovine skeletal muscle[J]. **Food Chemistry**, 2011, 124: 634-639.
- [25] SONG S M, PARK J H, KIM J, et al. Identification and characterization of *Paragonimus westermani* leucine aminopeptidase[J]. **Parasitology International**, 2008, 57: 334-341.
- [26] XI H, TIAN Y, ZHOU N, et al. Characterization of an n-glycosylated *Bacillus subtilis* leucine aminopeptidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Basic Microbiology**, 2015, 55: 236-246.
- [27] KONG Feng, TIAN Yaping. Strategy to obtain high yield of aminopeptidase from recombinant *Bacillus subtilis* and its extraction process optimization[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34(8): 864-873. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称: 中国化学会第十六届固态化学与无机合成学术会议

会议时间: 2020年8月6日-8日(5日全天报到)

会议地点: 北京 国家会议中心

主 办 方: 中国化学会

承 办 方: 中国科学院过程工程研究所

大会主席: 冯守华

学术委员会主席: 李玉良、陈 军

会议内容: 会议将围绕固态化学与无机合成的最新进展及其在能源、环境、催化、生命等应用交叉领域的发展动态, 深入探讨固态化学和无机合成所面临的机遇、挑战及未来发展方向, 推动我国在相关领域学科发展与技术进步。会议同时涵盖了固态化学及材料的光、电、磁功能; 纳米与低维材料; MOFs与无机多孔材料; 能源与环境材料; 生物无机与仿生材料; 催化及相关固态化学问题; 稀土固态化学与材料化学; 无机合成与制备化学等8类传统议题和新兴领域, 并穿插圆桌会议, 探讨固态化学与无机合成领域的关键问题, 如: 固态化学与无机合成的发展与未来; MOFs的终极目标; 石墨炔的制备与应用等多个研究热点。

联 系 人: 毛 丹 13581676838, 010-62533616

E-mail: wangdan@ipe.ac.cn

网址: <http://www.wd-homs.com/>