

Research
Bio-Manufacturing—Article

理性设计大幅提高一种丝孢堆黑粉菌来源脂肪酶催化活性——用于合成莫西沙星手性中间体

蔡雪^{a,b}, 沈江伟^{a,b}, 强煜^{a,b}, 华婧^{a,b}, 马樟奇^{a,b}, 柳志强^{a,b,*}, 郑裕国^{a,b}^a The National and Local Joint Engineering Research Center for Biomanufacturing of Chiral Chemicals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China^b Key Laboratory of Bioorganic Synthesis of Zhejiang Province, College of Biotechnology and Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2020

Revised 30 November 2021

Accepted 7 March 2022

Available online 18 October 2022

关键词

脂肪酶

丝孢堆黑粉菌

定点突变

分子动力学模拟

理性设计

莫西沙星

摘要

通过脂肪酶不对称拆分外消旋 *N*-乙酰基-哌啶-2,3-二甲酸二甲酯[*cis*-(±)-1], 从而获得手性中间体 (*S,S*)-2,8-二氮杂双环壬烷, 是合成氟喹诺酮类抗生素莫西沙星重要手性中间体的一条具有吸引力的工艺路线。在前期研究中, 筛选得到了一株丝孢堆黑粉菌 (SRL) 来源的脂肪酶, 该脂肪酶具有高热稳定性和 pH 值稳定性。但 SRL 来源的脂肪酶活性较低, 无法满足工业化应用的需求。因此本研究依据前期南极假丝酵母来源脂肪酶 B (CALB) 改造策略, 采用理性设计方法对 SRL 进行定点突变改造, 获得一个双突变体 SRL-I194N/V195L。随后, 确定了位于活性口袋外的环 6 上两个关键氨基酸残基 L145 和 L154; 获得四位点突变体 SRL-I194N/V195L/L145V/L154G (V13), 活性显著提高, 达到 $87.8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 是野生型 SRL 的 2195 倍 ($E > 200$)。该突变体在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下的半衰期达到 92.5 h。突变体 V13 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够高效拆分 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *cis*-(±)-1, 2 h 内底物转化率达到 49.9%, 实现严格立体选择性 ($E > 200$)。总体而言, 研究发现了一株对 *cis*-(±)-1 (*S,S*)-2,8-二氮杂双环壬烷具有高催化活性、严格立体选择性的脂肪酶, 可应用于工业化生产, 并为其他具有相似结构的脂肪酶和其他种类酶的活性提高提供了一种通用策略。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

莫西沙星 (moxifloxacin) 是第四代氟喹诺酮类广谱抗生素, 被广泛应用于治疗传染性细菌疾病[1]。与其他工艺路线相比, 通过脂肪酶催化对外消旋 *N*-乙酰-哌啶-2,3-二甲酸二甲酯[*cis*-(±)-1] 进行立体选择性拆分, 从而获得合成莫西沙星的重要手性中间体 (*S,S*)-2,8-二氮杂双环壬烷的路线 (图 1) 更受欢迎[2–4]。目前, 市面上和学术界已经存在许多具有底物广谱性的脂肪酶, 如德国 Novagen 公司生产的商品化脂肪酶 Novozym[®] 435 和著名的南极假丝

酵母来源脂肪酶 B (CALB)。然而这些脂肪酶只针对特定底物具有高催化活性和高立体选择性, 其应用范围受到了限制。例如, 在对 *cis*-(±)-1 的催化中, 这些脂肪酶的立体选择性低、酶用量大, 导致生产成本增加[5–6]。因此, 在生物转化中筛选得到具有高立体选择性和高催化活性的脂肪酶是十分必要的。

之前报道了以 2,3-吡啶二甲酸为初始原料, 通过高压加氢、酒石酸分解等步骤的化学拆分法, 以手性原料为起始材料的手性合成法, 以及将手性基团加入手性试剂中的不对称合成法[2,7–8]。然而这些方法都有共同的问题, 如

* Corresponding author.

E-mail address: microlu@zjut.edu.cn (Z.-Q. Liu).

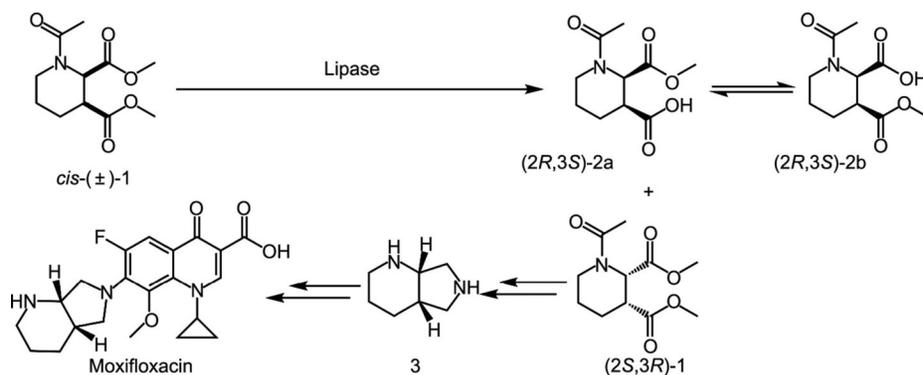


图1. 脂肪酶法拆分 *cis*-(±)-1 制备莫西沙星重要手性中间体路线示意图。

效率低下、原始材料价格高昂和需要使用金属催化剂等缺点。与化学拆分法相比,利用脂肪酶拆分生产(2*S*,3*R*)-*N*-乙酰-哌啶-2,3-二甲酸二甲酯[(2*S*,3*R*)-1]具有经济性高、选择性好、光学纯度高、副产物少、反应条件温和等优点[2]。Ramesh等[2]报道了当 *cis*-(±)-1 浓度为 $80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的液体 CALB (Addzyme® CALB; 5000 TBU, 1 TBU 表示每克固定化酶在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 pH 值为 7.5 条件下每分钟释放 $1 \mu\text{mol}$ 丁酸) 可在 16 h 内将底物完全拆分。近日, Shen 等[9]报道了一个脂肪酶 CALB 的突变体 (I189K), 能够催化更高浓度的底物, 减少了酶用量以及缩短了反应时间。具体来说, $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($243.26 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 *cis*-(±)-1 可以在 5 h 内被 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CALB 突变体 I189K 完全拆分, 其中突变体的比酶活为 $34.28 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 为目前报道的最高值。与 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物相比, 更高浓度的底物 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($486.52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的水解时间需要延长到 8 h, 且酶用量需要提高到原来的 8 倍。CALB-I189K 在 $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 下的半衰期为 58 h, 且在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, 24 h 时完全失去活性[9]。CALB 突变体的热不稳定性和高底物浓度下的酶活性抑制, 使得 CALB 突变体较难应对剧烈的工业催化环境, 限制了脂肪酶 CALB 的大规模工业化应用。

酶工程可以被分为三大类: 定向进化、半理性设计和理性设计[10–11]。定向进化和理性设计的结合构成了半理性设计, 这是一种构建“小而精”和高质量突变文库的有效策略[12–13]。理性设计是基于对蛋白质三维结构和催化机理深入细致的了解, 蛋白质的结晶体结构是必须的[14]。在之前的工作中, 分析了上千种对晶体结构脂肪酶理性设计没有用的脂肪酶的晶体结构。例如, 丝孢堆黑粉菌 (SRL) 来源的脂肪酶具有高热稳定性和 pH 值稳定性, 在 pH 值为 3~11 时稳定性较好, 72 h 后残余酶活性仍超过 75%, 并且在 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 下的半衰期达到 238 h [15]。另外, 通过酶工程获得了许多具有优越工业特性的 CALB 突变体, 尤其是盖子结构, 该结构位于与底物结合有关的酶催化位

点。值得注意的是, 之前的大多数研究都集中在提高脂肪酶对各种底物的立体选择性和稳定性上[16–19]。野生型 SRL 对 *cis*-(±)-1 表现出高稳定性和高立体选择性; 然而, 活性太低是限制因素。因此, 可以利用理性设计和定点突变结合的方式对野生型脂肪酶 SRL 进行改造, 以此获得更高酶活性的突变体, 从而应用于莫西沙星关键手性中间体的工业化生产。

2. 实验材料与方法

2.1. 质粒、菌株、化学试剂

重组质粒 pET22b-SRL 和 pPICZα-A-SRL 均由之前实验构建得到[15]。克隆宿主为大肠杆菌 DH5α (美国 Invitrogen 公司); 表达宿主 *Pichia pastoris* X-33 和大肠杆菌 Rosetta (DE3) (德国 Novagen 公司) 用于 SRL 及其突变体的表达。对应的抗生素 Zeocin™、对硝基苯酚、对硝基苯基 (p-NP) 酯 (C2~C16) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。其他的化学试剂均为分析级且可以通过购买获取。

2.2. 细胞培养和表达

大肠杆菌 Rosetta (DE3) /pET22b-SRL 培养在 96 深孔板中。首先在 LB 培养基 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母提取物、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛋白胨、 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 酵母粉、 $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 中, 氨苄霉素 (Amp) 和氯霉素 (Cm) 抗性终浓度分别为 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 按照 $5 \mu\text{L}$ 的接种量于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养 5 h, 然后加入终浓度为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙基 β-*D*-硫代半乳糖苷 (IPTG), 在 $22 \text{ }^\circ\text{C}$, $180 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下培养 12 h。结束后, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 6000 g 下离心 15 min 收集湿菌体 (型号: Eppendorf 5810R)。重组质粒 pPICZα-A-SRL 在毕赤酵母 X-33 中进行表达, 培养基为含有终浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Zeocin 抗性的 YPD 培养基 (酵母提取物

10 g·L⁻¹、蛋白胨 20 g·L⁻¹、葡萄糖 20 g·L⁻¹, pH 值 7.0)。将该培养基置于 30 °C 下培养三天, 并每隔 12 h 添加甲酯(体积分数为 1%) 进行诱导。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测 SRL 的表达情况。

2.3. 同源建模和结构分析

SRL 的三级结构以 CALB 晶体结构 1TCA 为模板, 利用 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源建模[20], 并对模型进行能量优化, 然后通过 PRO-CHECK 程序进行可靠性评估。采用 AutoDock 4.2 进行分子对接, 研究分子相互作用[21]。用 VMD 1.8.6 对 4 Å 范围内的盐桥进行模拟[22]。然后用 AutoDock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) [23] 研究 SRL 突变体和配体之间的相互作用, 利用 PyMol 2.1 软件 (<https://www.pymol.org>) 进行绘图。

2.4. 高通量筛选高活性 SRL 突变体

高通量筛选 SRL 突变体方法已在之前报道过[9]。简要步骤如下: 离心后弃去 96 深孔板中的上清, 加入 400 μL Tris-HCl 缓冲液 (5 mmol·L⁻¹, pH = 8.5) 重悬菌体。水解反应在 300 μL 透明 96 孔板中进行, 反应体系 (220 μL) 如下: 100 μL 重悬菌液、20 μL pH 指示剂 (0.5 mg·L⁻¹ 溴百里酚蓝溶于 5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液, pH = 8.5) 和 100 μL 底物溶液 [100 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 和 20 g·L⁻¹ (2R,3S)-1 或者 (2S,3R)-1 溶于 5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液, pH = 8.5]。首先将底物溶液和 pH 指示剂分别加入 96 孔板中, 再加入菌液混匀, 将 96 孔板静置于 37 °C 下, 开始水解反应。通过颜色变化初步筛选具有高活性和高立体选择性的正向突变体, 并进一步通过高效液相色谱 (HPLC) 分析验证。

2.5. 定点饱和突变和组合突变

利用易错聚合酶链反应 (PCR) 分别对脂肪酶 SRL 的第 145、149、154、156 和 159 号位点进行饱和突变, 建立饱和和突变文库。利用附录 A 表 S1 中的引物, 以 pPICZα-A-SRL 质粒为模版, 具体 PCR 混合体系 (50 μL) 为: Pfu Turbo DNA polymerase (2.5 U); dNTP 混合液 10 mmol·L⁻¹; 模板 DNA 10 ng, 2 × Pfu Buffer; 剩余体系由双蒸馏水 ddH₂O 补足。PCR 程序为: 98 °C 预变性 1 min, 1 个循环; 98 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 7 min, 共三个循环; 98 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 7 min, 共三个循环; 98 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 5 min, 共 15 个循环; 然后 72 °C 总延伸 5 min, 1 个循环。然后用 Dpn I 消除模板和回收后, 将扩

增的 PCR 产物连接到 pET22b (+) 载体中, 再化转入大肠杆菌 Rosetta (DE3)。正向定点饱和突变体的组合突变是通过定点饱和突变的方式得到的, 另外通过 DNA 测序的方式对突变体进行验证。

2.6. 利用 His-tag 标签对脂肪酶 SRL 进行蛋白纯化

脂肪酶 SRL 及其突变体均在 2 L 摇瓶中进行细胞培养 (400 mL 的 YPD 培养基、终浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的博拉霉素) 表达。SRL 的湿菌体用离心机 10 000 g、4 °C 下离心 20 min 得到, 然后使用镍柱 (5 mL, Bio-Scale Mini Nuvia™ IMAC Cartridges) 进行纯化。纯化流程为: 首先用缓冲液 A (50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液含 0.3 mol·L⁻¹ NaCl, pH = 8.0) 平衡柱子; 然后用缓冲液 B (50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液含 0.3 mmol·L⁻¹ NaCl 和 30 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH = 8.0) 冲洗层析柱, 洗脱不带 His-tag 标签的杂蛋白; 再用缓冲液 C (缓冲液 A 加 500 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱目的蛋白; 最后将纯化后的酶放在 20 mmol·L⁻¹ 的磷酸钠缓冲液 (pH = 7.0) 中进行透析, 结束后放在 -80 °C 冰箱保存备用。纯化后的酶通过 SDS-PAGE 进行跑胶验证, 并用 BCA 蛋白测定试剂盒 (江苏凯基生物技术股份有限公司) 进行蛋白含量检测。

2.7. 酶活性测定方法

通过酶催化 50 mmol·L⁻¹ 的 *cis*-(±)-1 底物, 水解成 (2R,3S)-1 的反应速率, 计算酶活性。反应体系 (1 mL) 如下: 磷酸钠缓冲液 (100 mmol·L⁻¹, pH = 7.0), 50 mmol·L⁻¹ 的底物 *cis*-(±)-1, 10 μg 纯酶, 于 35 °C, 800 r·min⁻¹ 条件下反应 30 min, 加入 30 μL、6 mol·L⁻¹ HCl 终止反应, 取 500 μL 反应液用 1 mL 乙酸乙酯萃取, 取 200 μL 有机相在 25 °C 下挥干, 再加入 1 mL 流动相进行溶解和一定量无水硫酸钠进行干燥。用 HPLC 检测转化率及立体选择性。酶活单位 (U) 定义为: 在 pH = 7.0、35 °C 条件下, 每分钟水解 1 μmol (2R,3S)-1 所需酶量定义为一个酶活单位。

2.8. 脂肪酶 SRL 及其突变体的表征

(1) pH 值和温度对酶活性和稳定性的影响。考察了不同 pH 值 (5.0~10.0) 和不同反应温度 (35~60 °C) 对 SRL 及其突变体酶活性和稳定性的影响。其中所有的不同 pH 值缓冲液的浓度均为 100 mmol·L⁻¹, 包括柠檬酸钠缓冲液 (pH = 5.0、5.5 和 6.0)、磷酸钠缓冲液 (pH = 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH = 8.0、8.5 和 9.0) 和碳酸氢钠缓冲液 (pH = 9.0、9.5 和 10.0)。以 *cis*-(±)-1 为底物, 反应温度为 35 °C。将纯酶置于不同 pH 值的缓冲液 (100 mmol·L⁻¹, pH = 5.0~10.0) 中, 在 35 °C 保

温 3 h 后, 检测残余酶活性, 以未进行温浴的脂肪酶活性作为对照, 设定为 100%。另外用磷酸钠缓冲液 ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$) 进行温度稳定性分析。将纯酶置于磷酸钠缓冲液 ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 6.0$) 50°C 下保温 0~96 h, 定时取样, 在 35°C 下测定残余酶活性, 检测最佳 SRL 正向突变体在 60°C 下的温度稳定性。

(2) 动力学参数测定。纯酶的动力学参数通过以 *cis*-(±)-1 为底物, 按照酶活性测定方法, 测定不同底物浓度 ($2\sim 200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下的初始反应速率得到。采用 Origin-Pro 8.0 软件中米氏常数方程式进行非线性拟合, 得到动力学参数米氏常数 K_m 和最大反应速率 V_{\max} , 再根据酶浓度 (E), 利用公式计算得到酶的转化数 k_{cat} 。

(3) 圆二色谱分析稳定性。进一步考察了温度对 SRL 及其突变体稳定性的影响, 利用圆二色光谱仪 Chirascan™ V100 (英国 Applied Photophysics 公司) 测定 SRL 及其突变体在不同温度下二级结构的变化。将检测纯酶置于磷酸钠缓冲液 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$), 蛋白浓度为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在 $30\sim 90^\circ\text{C}$ 的温度范围内以 $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温, 收集 $180\sim 260 \text{ nm}$ 波长范围内的圆二色光谱数据, 采用 Global 3 分析软件进行数据处理及分析。

2.9. 高效液相色谱法检测产量

高效液相色谱仪为日本 Shimadzu UFLC 系统, 搭配 SPD-20A UV 检测器。检测条件[15]为: 手性色谱柱 Chiralpak® IG ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; 日本 Daicel 公司); 流动相为正己烷与乙醇的混合液 (二者体积比为 6:4), 流速为 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 220 nm , 柱温为 30°C , 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。在上述检测条件下 (2*R*,3*S*)-1 和 (2*S*,3*R*)-1 保留时间分别为 11.6 min 和 14.7 min 。对所有的样品均检测两次。

2.10. SRL 及其突变体拆分 *cis*-(±)-1 实验

考察 SRL 及其突变体拆分 *cis*-(±)-1 的能力以及底物浓度对拆分进程的影响。反应体系 (30 mL) 如下: $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{pH} = 7.0$ 的磷酸钠缓冲液中含有 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 底物 *cis*-(±)-1, $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的纯酶, 于 35°C 下进行反应, 反应过程中通过自动流加 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 以维持反应体系的 pH 值 (为 7.0), 定时取样, HPLC 测定转化率及立体选择性。

2.11. 约束分子动力学模拟

根据 Cai 等[12]给出的方法对野生型 SRL 及其突变体进行分子动力学模拟。使用 GROMACS 软件 5.1 版本[24] 和 Amber99SB-ILDN 力场[25], 在 323 K 下进行 20 ns 的模

拟。所有系统均溶解在三点水模型 (TIP3P) 中, 将距每个脂肪酶边缘的最小距离设为 1 nm , 并加入生理浓度 ($154 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的氯化钠溶液以中和该系统。能量最小化并达到平衡后, 在等温-等压条件下 (35°C 、 1 bar) 对每个系统进行了 20 ns 的模拟, 积分步长为 0.002 ps 。使用 GROMACS 软件计算均方根偏差 (RMSD) 及其他参数, 研究酶的热稳定性。

2.12. 数据统计与分析

通过 Excel 2011 (美国微软公司) 进行数据统计和分析; 通过 SAS 程序 8.1 版本进行方差分析。所有酶实验的测定和分析均不少于三次。

3. 结果与讨论

3.1. 野生型 SRL 和 CALB 的结构比较

基于结构模拟分析, 并通过理性设计提高酶的热稳定性和催化活性是一种常用的蛋白质改造方法。然而, 蛋白质的晶体结构复杂且需要耗费大量时间去获得和分析[14]。数据库中蛋白质信息的大规模扩增, 是一种免费而有价值的资源, 可以用来满足蛋白质工程领域的研究人员对蛋白质结构预测的需求[26]。首先, 对野生型 SRL 和 CALB 进行结构比较研究, 以了解 SRL 的结构与功能关系, 用于后期用来提高 SRL 酶活性的酶工程。

SRL 的三维结构模型是以 Uppenberget 等[27]解析得到的 CALB 晶体结构 (PDB: 1TCA) 为模板进行模拟得到的, 其中 SRL 氨基酸序列与 CALB 具有较高的序列一致性, 达到了 73.5%。SRL 的三维结构模型如图 2 和图 3 所示, 可以分析并确定 SRL 的催化三联体为 D192-H230-S110, 氧阴离子孔由 T46 和 Q111 构成, 另外还有三对二硫键 (C28—C70、C222—C264、C299—C317), 这些功能结构与 CALB 保持一致。SRL 具有典型的 α/β 水解酶折叠结构, 具有由 α 螺旋包围的 9 条 β 链组成的中心 β 折叠。总的来看, SRL 与 CALB 在催化功能上具有很高的相似性, 然而关键结构域存在明显差异, 也可能导致催化活性的差异。SRL 和 CALB 对底物 *cis*-(±)-1 的酶活性分别为 $0.04 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.12 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

在前期对 CALB 的突变研究中, 构建了 189 和 190 位点的单点饱和突变文库, 其中酶活性最高的正向突变体 CALB-I189K 的比酶活是野生型 CALB 的 286 倍[9]。基于 CALB 与 SRL 的序列和结构的相似性, 假设在对 SRL 的 194 和 195 位点进行突变会有类似的影响。对 SRL 相应的位点 I194 和 V195 进行定点突变, 构建突变体 SRL-I194A、

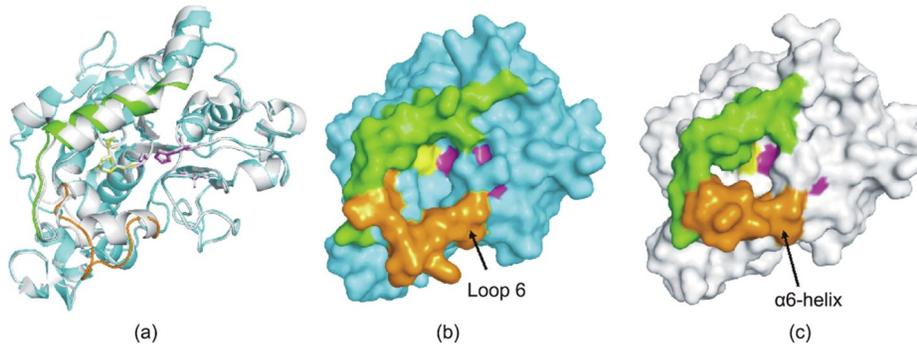


图2. 脂肪酶SRL三维结构模型图。(a) 同源模型SRL (青色) 和CALB (1TCA, 灰色) 的结构覆盖。SRL中的催化三元组Ser110-Asp192-His230用洋红色表示, 氧阴离子孔 (T46和Q111) 用黄色表示, SRL中的环6用橙色表示, $\alpha 10$ 用绿色表示。(b) 和 (c) 分别代表预测的SRL和CALB的分子表面。

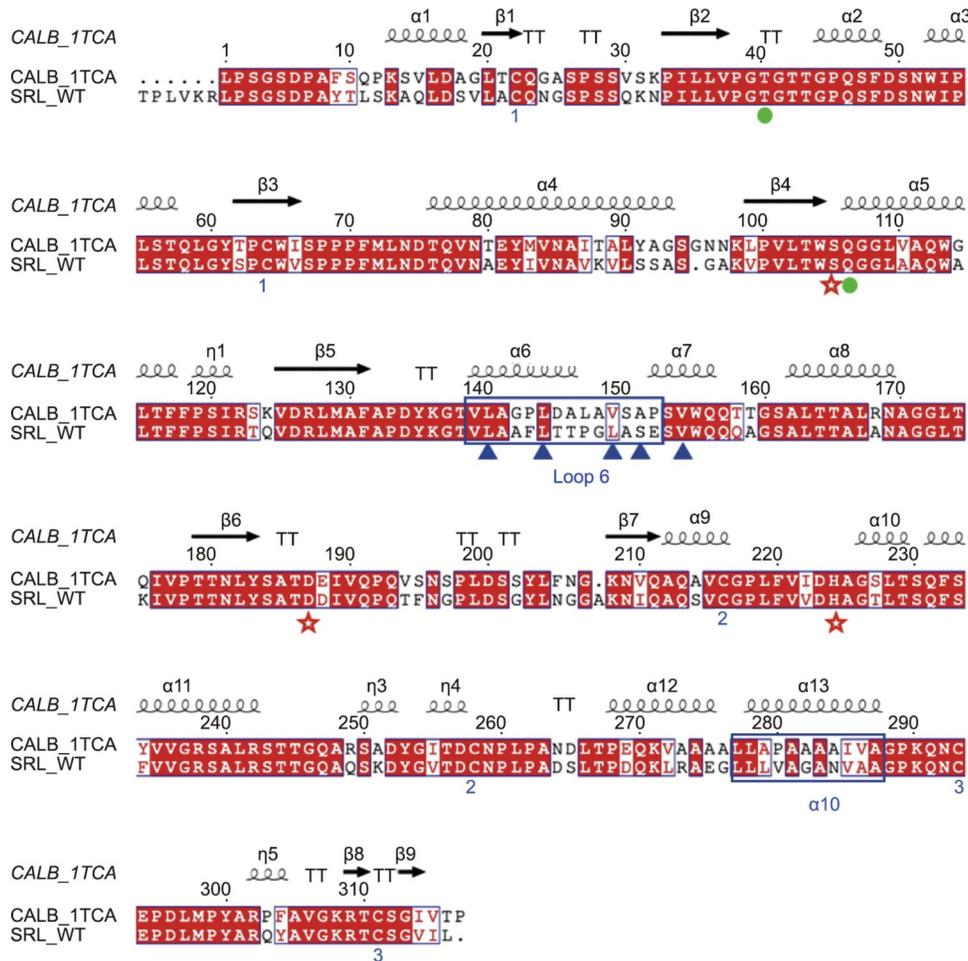


图3. CALB和野生型SRL (SRL_WT) 之间的氨基酸序列比对。基于先前报道的CALB结构 (PDB: 1TCA; CALB_1TCA) 描述了二级结构元素和残基。催化三联体 (SRL中的S110、D192和H230) 用红星表示, 氧阴离子孔 (SRL的T46和Q111) 用绿色圆圈表示, 三对二硫键 (SRL内的C28—C70、C222—C264和C299—C317) 分别编号为1、2和3。SRL中环6 (144—157) 和螺旋 $\alpha 10$ (283—293) 中的残基封闭在蓝色方框中。SRL中含有SSM的残基 (L145、L149、L154、S156和V159), 用蓝色三角形表示。使用ESPrInt在线软件进行排列对齐。

SRL-I194R、SRL-I194K、SRL-I194N/V195L、SRL-I194H/V195L和SRL-I194Y/V195L。如表1所示, 6个突变体与野生型SRL相比对底物 *cis*-(±)-1 催化活性都有不同程度的提高, 并且都保持严格的立体选择性。其中最优突变体SRL-I194N/V195L的比酶活达到 $10.20 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 是野生型

SRL的255倍; 但突变体SRL-I189N/V190L的催化活性仅为CALB-I189K的1/3, 还具有很大的改造潜力。其余突变体的比酶活与CALB对应的突变体相比都明显降低[9]。有趣的是, 相应的氨基酸残基的突变对SRL酶活性影响与对CALB酶活性影响相比具有较大的差异, 呈现不同的规律。

例如, CALB 最优突变体 CALB-I189K 与野生型相比, 比酶活提高 286 倍; 而 SRL-I194K 比酶活仅为 $0.72 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 与野生型相比, 比酶活仅提高 18 倍。Cen 等[28]报道了一种具有 Cys-His-Asp 催化三联体的高活性半胱氨酸脂肪酶。此外, 其他的突变, 如 W104V/ A281Y/A282Y/V149G, 可以在 4-硝基苯酯水解中表现出比野生型 CALB 高 40 倍的催化效率, 并且耐受高浓度底物。Stauch 等[29]报道了 CALB 结构 (PDB: 5A71) 中的两个独立的蛋白单体 A 和 B。在单体 B 中的氨基酸残基 Leu140~Leu147 中, 发生了显著的构象变化, 形成了一个未展开的环。在 SRL 的相应区域, 构象被预测为一个环, 该区域位于活性口袋的入口, 作为一个盖子, 控制底物的进入和产物的释放。因此, 环 6 中的氨基酸残基可能对 SRL 的催化活性有显著的影响, 为进一步的蛋白质工程提供了方向。

3.2. 基于理性设计和组合突变的 SRL 的位点饱和和突变

尽管在环 6 的氨基酸残基已缩小到了 14 个, 但是进一步利用在线服务网站 HotSpot Wizard 进行蛋白质热点分析 (见附录 A 中的图 S1), 缩小突变文库[30]。首先以 SRL-I194N/V195L (V6) 为模板, 选择了 L145、L149、L154/S156 和 V159 位点进行定点饱和和突变。从 4 个构建的饱和和突变文库中筛选出 1600 个突变体, 在 L145 位点和 L154/S156 位点分别有两个和三个正向突变, 经初筛和复筛得到正向突变株, 并经基因测序验证分析, 去除重复突变 (见表 2 和附录 A 中的图 S2)。结果表明, L149 和 V159 位点没有筛选得到正向突变体。突变体 V7、V8、V10 和 V11 分别是 L145N、L145V、L154G 和 S156H 的三位点突变体, 而 V9 是四位点突变体。通过比色筛选法比较酶活性, 其中三位点突变体 V10 的酶活性最高, 甚至高于四位点突变体 V9, 说明突变 L154G 的显著性意义。此外, 突变体 V7 (L145N) 和 V8 (L145V) 的比酶活均高于突变体 V11 (S156H)。另外基于亲本 V6 (SRL-I194N/V195L) 构建了 L145N 和 L154G (V12) 以及 L145V 和 L154G (V13) 的组合突变体。突变体 V7~V13 用于后续的酶学性

质研究。

3.3. SRL 及其突变体的酶学性质表征

3.3.1. 酶活性检测

通过高效液相色谱检测野生型 SRL (V0) 和对应的 8 个突变体 (V6, V7~V13) 纯酶对底物 *cis*-(±)-1 的水解活性及立体选择性 (见附录 A 中的图 S3 和图 S4)。如表 2 所示, 三位点突变体 V7 (SRL-I194N/V195L/L145N) 和 V8 (SRL-I194N/V195L/L145V) 比酶活分别达到 $21.5 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 和 $27.0 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 是 V6 (SRL-I194N/V195L) 的 2.1 倍和 2.6 倍; V10 (I194N/V195L/L154G) 的比酶活是三位点突变体中最高的, 达到 $30.3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 是 V6 (SRL-I194N/V195L) 的三倍、野生型 V0 的 757 倍。为了更好地分析, 对四位点突变体 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 进行研究, 结果表明该突变体对底物 *cis*-(±)-1 的比酶活达到 $87.8 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 是 V6 的 8.6 倍、野生型 V0 的 2195 倍、CALB-I189K ($34.3 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$) 的 2.6 倍[9]。突变体 V11 (S156H) 与亲本 V6 具有相似的酶活性, 而 L154G 号位点的另一个突变体 V9 却比 V11 的活性更高。对四位点突变体 (V13) 和三位点突变体 (V8) 的酶活性进行对比, 结果表明 V13 的比酶活比 V8 提高 3.3 倍。进一步比较 V11 和 V9、V13 和 V8, 发现 154 位点残基对于酶活性具有重要意义。所有 SRL 突变体均对底物 *cis*-(±)-1 具有严格的立体选择性, 对应选择性大于 200。

3.3.2. 动力学参数

SRL 突变体的动力学参数如表 2 所示。由于野生型 SRL 的酶活性极低, 因此无法测定其动力学参数。结果表明 SRL 突变体对底物 *cis*-(±)-1 的亲合力与野生型 SRL 明显不同, 这与 194 位点和 195 位点的氨基酸残基突变有关。这两个位点位于底物结合口袋, 与底物直接接触。从 K_m 值观察, 突变体 V13 对底物 *cis*-(±)-1 的亲合力是最强的, V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 的 V_{max} 明显提高, 由 V6 (SRL-I194N/V195L) 的 $63.0 \mu\text{mol}\cdot(\text{mg}\cdot\text{min})^{-1}$

表 1 SRL 及其突变体在拆分 *cis*-(±)-1 时的比酶活与立体选择性

Variant	Mutation	Specific activity ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Relative activity (%)	<i>E</i>
V0	Wild-type SRL	0.04 ± 0.10	100	> 200
V1	SRL-I194A	1.70 ± 0.10	4 250	> 200
V2	SRL-I194R	1.20 ± 0.10	3 000	> 200
V3	SRL-I194K	0.70 ± 0.10	1 750	> 200
V4	SRL-I194Y/V195L	0.90 ± 0.10	2 250	> 200
V5	SRL-I194H/V195L	2.90 ± 0.10	7 250	> 200
V6	SRL-I194N/V195L	10.20 ± 0.10	25 500	> 200

表2 纯化的野生型SRL及其突变体的比活性、对映体选择性和动力学参数

Methodology	Lipase	Mutation	Spec EA (U·mg ⁻¹)	Rel EA (%)	<i>E</i>	<i>K_m</i> (mmol)	<i>V_{max}</i> (μmol· (mg·min) ⁻¹)	<i>k_{cat}</i> (min ⁻¹)	<i>k_{cat}</i> / <i>K_m</i> (min ⁻¹ ·mmol ⁻¹)
Rational design	V0	wild-type	0.04 ± 0.10	100	> 200	ND	ND	ND	ND
	V6	I194N/V195L	10.20 ± 0.10	25 500	> 200	386.7 ± 74.7	63.0 ± 9.6	2175.0 ± 330.6	5.6
SSM	V7	I194N/V195L/L145N	21.50 ± 0.20	53 750	> 200	231.9 ± 29.5	101.2 ± 9.0	3493.7 ± 311.2	15.0
	V8	I194N/V195L/L145V	27.00 ± 0.60	67 500	> 200	183.0 ± 21.7	122.3 ± 9.5	4224.2 ± 329.5	23.0
	V9	I194N/V195L/L154G/S156H	28.20 ± 0.30	70 500	> 200	191.2 ± 20.4	125.5 ± 8.6	4506.8 ± 321.1	23.6
	V10	I194N/V195L/L154G	30.30 ± 0.20	75 750	> 200	133.5 ± 17.7	101.4 ± 8.1	3503.7 ± 279.8	26.2
	V11	I194N/V195L/S156H	11.30 ± 0.20	28 250	> 200	362.2 ± 43.1	67.1 ± 8.3	2249.3 ± 310.4	6.2
Combinatorial mutagenesis	V12	I194N/V195L/L145N/L154G	55.40 ± 4.20	138 500	> 200	150.2 ± 20.6	180.7 ± 15.4	6240.3 ± 531.6	41.5
	V13	I194N/V195L/L145V/L154G	87.80 ± 6.20	219 500	> 200	95.5 ± 13.0	238.4 ± 17.4	8233.3 ± 602.0	86.2

Spec EA: specific activity; Rel EA: relative activity; *k_{cat}*: turnover number; ND: not detected.

提高至 238.4 μmol·(mg·min)⁻¹，其转化数 *k_{cat}* 是亲本的 3.8 倍。*k_{cat}*/*K_m* 的数值体现了酶的催化效率，最优突变体 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 的 *k_{cat}*/*K_m* 值分别是亲本 V6 (SRL-I194N/V195L) 的 15.4 倍，是 CALB 最优突变体 CALB-I189K 的 1.4 倍。而突变体 V9 和 V11 包括 S156 位点突变，对酶活性的增强没有显著影响，因此，本研究没有对 V9 和 V11 进行进一步的实验。

3.3.3. pH 值和温度对突变体活性及稳定性的影响

由于突变体表面的整体电荷变化，突变体的最佳温度和 pH 值也会发生变化[9,12]。因此必须在 35 °C 的不同 pH 值缓冲液 (pH = 5~10) 中确定温度和 pH 值对 SRL 突变体活性和稳定性的影响。在 35 °C 反应温度下，测定不同 pH 值 (5~10) 缓冲溶液中野生型 SRL 及其突变体的催化活性，得出最适 pH 值。所有 SRL 突变体的最适 pH 值都由 5.5 变化到 7.0 [图 4 (a)]。许多微生物脂肪酶具有耐热性 (在温度高于 70 °C 时具有最佳活性) 和碱稳定性 (在 pH 值大于 9 时具有最佳活性) [31]，而 SRL 及其突变体表现出独特的酸稳定性。基于 CALB 突变体，在底物结合口袋进行酶工程改造后，最适 pH 值向碱性环境发生了迁移 [9]。而通过引入极性氨基酸，在 194 位点的天冬酰胺和 195 位点的亮氨酸，可能会改变活性口袋附近的静电势。除突变体 V6 (SRL-I194N/V195L) 外，其余突变体的催化反应 pH 值适应范围相比野生型 SRL 更宽，其中最优突变体 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 在 pH = 5.0~9.0 时具有 60% 以上的相对活性。对 SRL 及其突变体的 pH 值稳定性考察结果如图 4 (b) 所示，SRL 及突变体在 pH = 4.0~10.0 时具有极好的稳定性；在不同 pH 值下，35 °C 保温 6 h 后，保留 90% 以上的初始酶活性，说明在 194、195、145、154 位点引入突变点对 SRL 高 pH 值稳定性的特性影响不大。

所有突变体的最适温度均与野生型 SRL 一致，为 55 °C [图 4 (c)]。当反应温度上升到 65 °C 时，除了突变体 V12 (I194N/V195L/L145N/L154G)，其余所有突变体的催化活性均有所下降。在温度稳定性方面，所有突变体的温度稳定性与野生型 SRL 相比都有所降低。当在 50 °C、pH = 7.0 的磷酸钠缓冲液中温浴 96 h 后，野生型 SRL 保留 90% 左右的初始酶活性，半衰期达到 597.5 h；突变体 V6 (SRL-I194N/V195L) 能够保留 40% 左右的初始酶活性，半衰期下降为 249.3 h。而引入更多的氨基酸突变的突变体 V7、V8、V10、V13 的半衰期更短，分别为 91.8 h、115.1 h、110.2 h、92.5 h [图 4 (d)]。另外考察了突变体 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 在 60 °C 下的稳定性，在 60 °C 下酶活性下降明显，保温 9 h 后保留 23% 左右的初始酶活性，半衰期仅为 4.1 h (见附录 A 中的图 S5)。与 CALB 突变体相比，突变体 I189R 的最适反应温度从 45 °C 下降到 40 °C [9]，而 SRL 突变体保持了与野生型 SRL 相同的温度。综合以上结果发现，突变点的引入能够明显提高酶的催化活性，但是对酶的热稳定性有较大的影响，酶活性与稳定性处于一个此消彼长的动态平衡中。

3.3.4. 热稳定性分析

为了进一步分析突变对 SRL 热稳定性的影响，对 SRL 及其突变体进行了圆二色谱分析。如图 5 所示，在 192 nm 波长附近的正值肩峰谱带以及在 222 nm 和 208 nm 波长处的两个负值肩峰谱带是蛋白质的 α 螺旋结构的特征肩峰谱带[32]。野生型 SRL 在 30~60 °C 下 α 螺旋结构没有明显变化，而所有突变体在温度升高的过程中结构有较大的变形，α 螺旋结构明显减少。如图 5 (d) 所示，野生型 SRL 的 *T_m* 值为 74.3 °C，而突变体 V6 的 *T_m* 值下降了 10 °C，为 63.5 °C (图 6)。这一结果与 V6 的热稳定性一致，说明

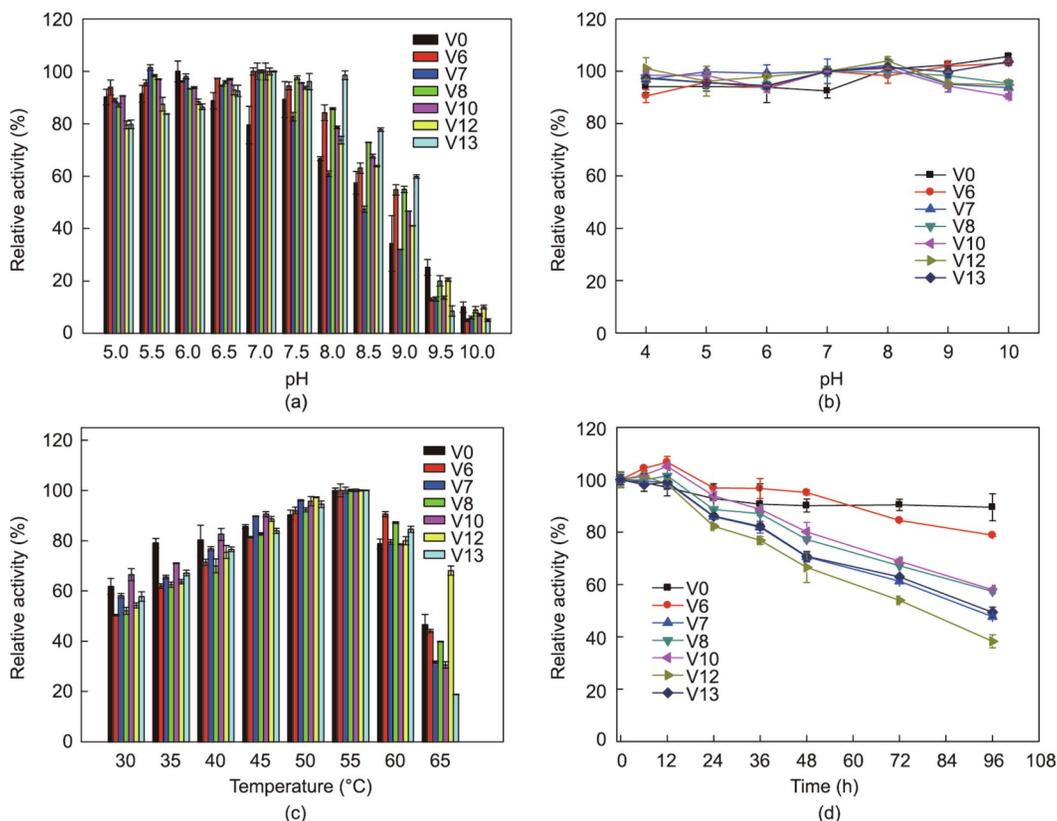


图4. pH值和温度对SRL (V0) 及其变体 (V6、V7、V8、V10、V12、V13) 的酶活性和稳定性的影响。(a) pH值对酶活性的影响；(b) 野生型SRL和突变体的pH值稳定性；(c) 温度对酶活性的影响；(d) 野生型SRL和变体在50 °C下的热稳定性。

I194N和V195L两个突变对所有突变体的热稳定性有较大的影响。而在145位点和154位点 (V7、V8、V10、V12和V13) 引入更多突变后, T_m 值比V6的 T_m 值降低了约2 °C; 然而, 三位点 (V7、V8、V10) 和四位点 (V12、V13) 突变体具有相似的 T_m 值。

3.4. SRL及四位点突变体V13催化拆分 *cis*-(±)-1

为了验证最优突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 水解拆分 *cis*-(±)-1的能力, 考察了野生型SRL和突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 对1.0~2.0 mol·L⁻¹的底物 *cis*-(±)-1的反应进程 (图7)。突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 的反应速率非常快, 2 h后转化率达到49.9%, $E > 200$, 明显高于突变体CALB-I189K的反应速率, 突变体CALB-I189K需要反应5 h转化率才能达到49.9% [9]。而野生型SRL在反应2 h后, 转化率仅为0.2% [图7 (a)]。根据Xu等[16]的结论, 认为CALB结合口袋189位点和190位点的氨基酸残基具有立体选择性意义, 4种突变体可以合成所有可能的立体异构体。四位点突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 不仅明显提高了SRL在高浓度底物下的催化效率, 而且保留了SRL的严格立体选择性。另外, 继

续考察了突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 的催化反应进程。如图7 (b) 所示, 在保持用酶量为0.1 g·L⁻¹不变的情况下, 将底物浓度提高至1.5 mol·L⁻¹后, 反应6 h, 转化率达到49.9%, 继续提高底物浓度至2 mol·L⁻¹, 水解反应前期速率基本与底物浓度为1 mol·L⁻¹时保持一致。随着反应的进行, 水解速率逐渐降低, 反应进行20 h时, 转化率达到49.7%。因此可以推测与CALB突变体类似, 高底物浓度对酶的结构具有破坏作用, 但是突变体V13相比于突变体CALB-I189K具有更高的催化活性及底物耐受能力, 这可能与突变体V13具有更高的结构稳定性有关[9]。上述结果表明突变体V13同时具备了高催化活性、高立体选择性和高稳定性的特点, 是工业化拆分 *cis*-(±)-1理想的生物催化剂。

3.5. SRL及其突变体的分子模拟分析

以CALB晶体结构1TCA为模型, 通过Modeller 9.18同源建模, 分别构建了野生型SRL和突变体V6、V8、V10和V13的三维结构模型。如附录A中的图S6所示, 在分子动力学模拟过程中, RMSD反应了蛋白质结构中碳骨架在整个模拟过程中的振动情况, 研究发现SRL及其突变体在分子动力学模拟进行到5 ns后基本处于平衡状

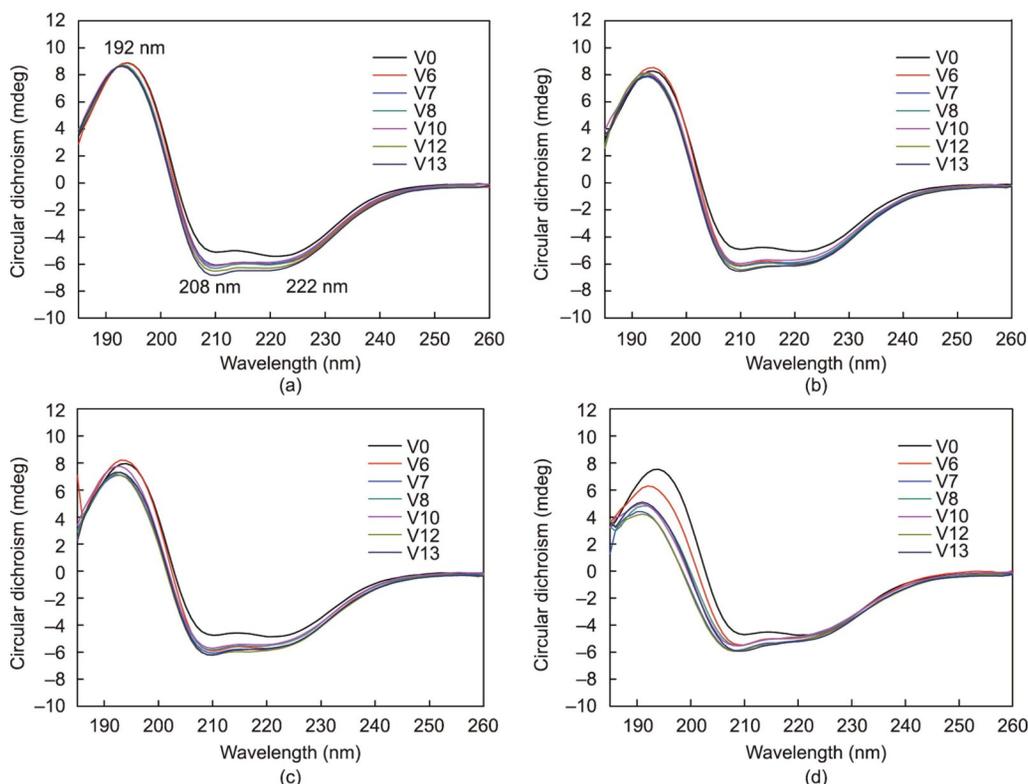


图5. 野生型SRL及其突变体在30 °C (a)、40 °C (b)、50 °C (c) 和60 °C (d) 上的圆二色谱图。

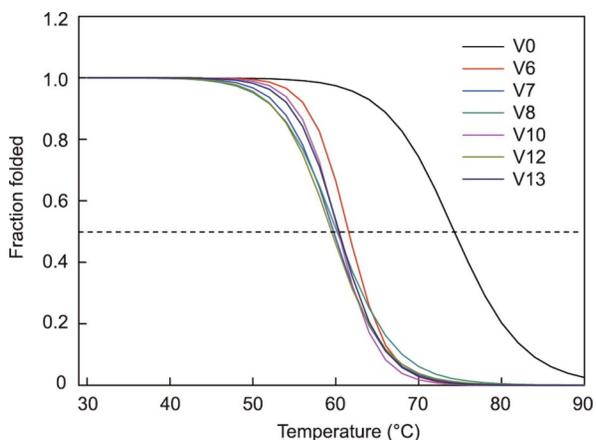


图6. 野生型SRL及其突变体的热稳定性曲线。

态, 表明酶分子在溶剂盒子中处于稳定状态, 可以用于后续的分析。

突变体 SRL-I194N/V195L (V6) 催化活性口袋的形状与野生型 SRL (V0) 相比发生变化, 底物在催化活性口袋中的结合位置上发生移动。突变体 V6 和野生型 SRL 的催化口袋形状也有所不同。CALB 的催化机理从 20 世纪 90 年代开始得到解释, 直到 2010 年以后酶分子晶体结构研究才取得了重要进展[33]。在 CALB 中, 通过将处于 194 位的具有较大空间位阻和疏水性的异亮氨酸残基突变为具有较小空间位阻和亲水性的天冬酰胺残基, 不仅降低

了与底物分子结合的阻碍, 而且在 N194 的酰氨基与底物 2 号位酯键的酰基形成氢键, 从而对底物产生一个明显的固定作用力, 使得底物分子在催化活性口袋中处于更容易被水解的状态。这主要体现在催化亲核进攻的 S110 的氧原子与底物酰基碳原子之间的距离 r (O—C) 以及 H230 的氮原子与底物醇基氧之间的距离 r (N—O)。如图 8 (a)、(b) 所示, 突变体 V6 中 r (O—C) 和 r (N—O) 的距离是酶活性提升的原因。Stauch 等[29]在 CALB 5A71 中报道了类似的结果。 r (O—C) 距离的缩短有利于四面体过渡态的形成和来自 110 位丝氨酸残基中氧阴离子对底物 (2*R*,3*S*)-1 的亲核攻击。底物酰基氧与氧阴离子空穴之间的距离越短, 越有利于形成氢键, 越能够使底物稳定地形成四面体过渡态, 越有利于催化反应。

如图 9 所示, 对于突变体 SRL-I194N/V195L/L145V (V8)、SRL-I194N/V195L/L154 (V10) 和 GSRL-I194N/V195L/L145V/L154G (V13) 催化活性的进一步提升, 推测可能与脂肪酶盖子结构的移动相关。一般脂肪酶催化过程中存在“界面激活”作用[34–35], 然而由 α 5 螺旋构成的 CALB 盖子结构较小, 且与酯酶相似, 能够水解很多水溶性底物, 因此 CALB 一直被认为缺乏“界面激活”作用[36]。但是近期研究人员发现和证明了 CALB 的 α 5 螺旋盖子结构具有很大的柔性, 在催化过程中会发生惊人的构象

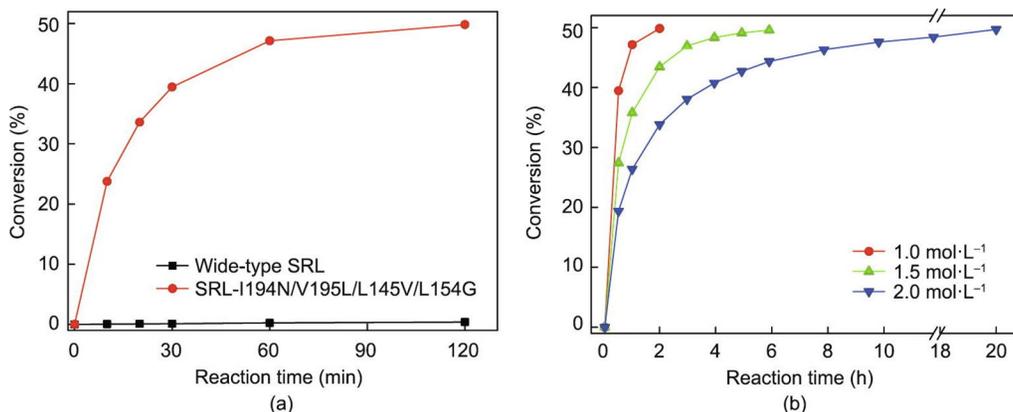


图7. 使用野生型SRL和四位点突变体V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) 纯酶催化 *cis*-(±)-1 的催化曲线。(a) 1 mol·L⁻¹ 底物与野生型SRL (0.1 g·L⁻¹) 和 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) (0.1 g·L⁻¹); (b) 1.0~2.0 mol·L⁻¹ 底物 V13 (SRL-I194N/V195L/L145V/L154G) (0.1 g·L⁻¹)。反应于 35 °C 下进行, 反应过程中通过自动流加 2 mol·L⁻¹ NaOH 维持反应体系的 pH 值 (为 7.0)。

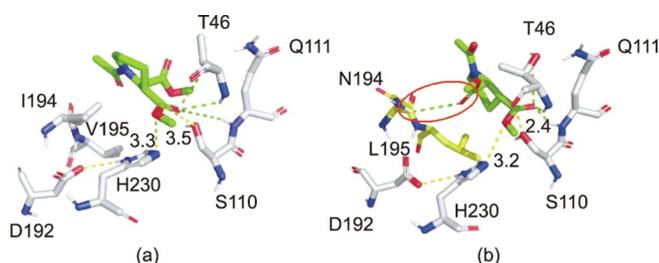


图8. (2R,3S)-1 (绿色) 与野生型SRL (a) 和突变体SRL-I194N/V195L (b) 的活性位点的分子对接模拟图。催化三联体D192-H230-S110用红色表示, 氧阴离子孔用蓝色表示, 野生型CALB中的残基用橙色表示 (I194、V195), 突变后的残基用黄色表示。对于氧阴离子的相互作用和稳定的H键用绿色虚线表示。在(2R,3S)-1的碳基功能上, 催化三联体中丝氨酸的有效亲核攻击的距离用黄色虚线标记。

变化[37]。Zhou等[29,36]通过长时间分子动力学模拟发现, α 5螺旋上的D145与 β 8片层上R309之间形成的盐桥相互作用, 以及 α 5螺旋上的疏水性残基L144、L147与 α 6螺旋上的W155之间的疏水相互作用能够稳定盖子结构处于“打开”状态, 而 α 5螺旋上疏水性残基P143、L144、L147和V149与 α 10螺旋上疏水性残基V286和K290的疏水性侧链之间的相互作用使得盖子结构处于“关闭”状态。另外, α 12螺旋上A282, L278和I189所在环区之间的疏水性相互作用会增强 α 6与 α 10螺旋之间的疏水作用。与CALB相比, SRL的螺旋盖子区域具有更开放的构象; 因此, 在 β 8薄片上形成含有氨基酸R314的盐桥是很困难的。假设V13中145位点和154位点的突变残基位于灵活的环6上, 亮氨酸分别变为缬氨酸和甘氨酸, 那么环6和 α 10螺旋上的氨基酸残基为配体的结合提供了合适的碰撞。

4. 总结与展望

本研究通过定点饱和突变、定点突变和组合突变等方

法, 以增强SRL对 *cis*-(±)-1 的酶活性, 达到 87.81 U·mg⁻¹。并揭示了位于SRL的145和154位点的两个关键氨基酸残基的相关盖子构象, 并确定在环6的底物结合口袋附件, 两个关键氨基酸残基的适当改变可以改变盖子结构的状态, 从而增强酶活性。本文以脂肪酶法立体选择性拆分制备莫西沙星手性中间体为目标, 得到了可用于工业化生产的脂肪酶, 并对酶活性相关的关键氨基酸进行了研究。可以通过进一步的工作, 如结晶, 对SRL及其突变体进行更深入的结构见解, 并开发固定化技术, 以增强稳定性、可重复使用性, 使得后续产品更容易分离, 以达到工业化应用水平。

致谢

感谢国家重点研发计划(2021YFC2102100、2018YFA090140)、国家自然科学基金(32000898)、浙江省省属高校基本科研业务费(RF-C2019005)和浙江省自然科学基金(LQ21B060006)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Xue Cai, Jiang-Wei Shen, Yu Qiang, Jing Hua, Zhang-Qi Ma, Zhi-Qiang Liu, and Yu-Guo Zheng declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online

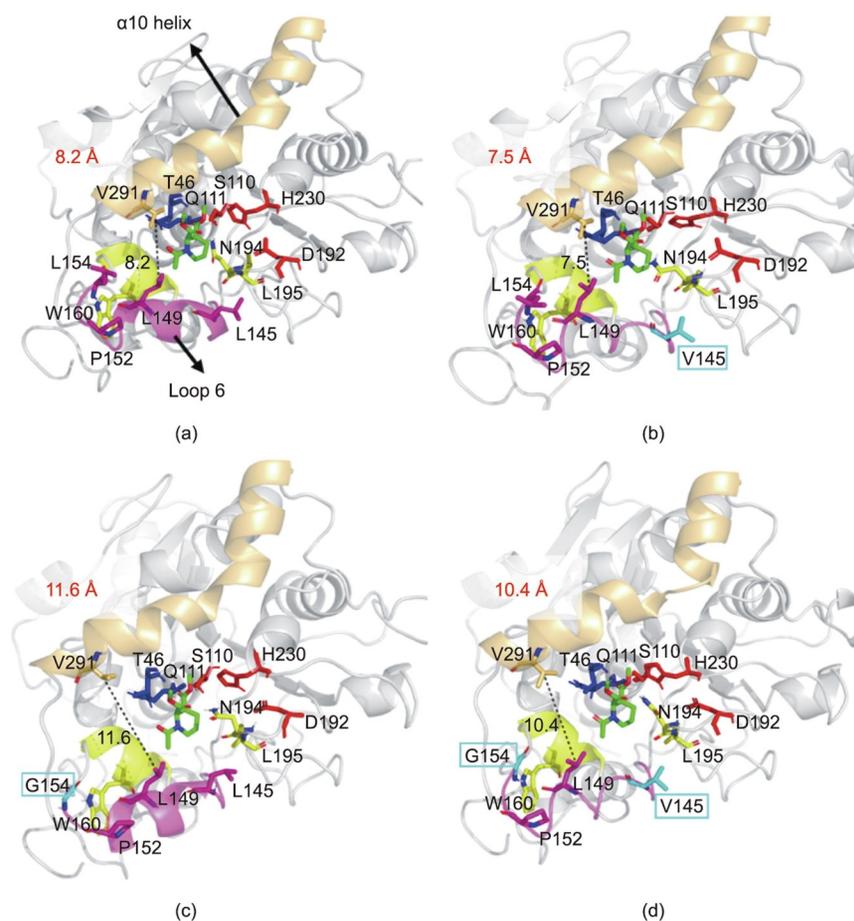


图9. (2R,3S)-1 (绿色) 与 SRL 突变体的活性位点的分子对接模拟图。(a) SRL-I194N/V195L (V6); (b) SRL-I194N/V195L/L145V (V8); (c) SRL-I194N/V195L/L154G (V10); (d) SRL-I194N/V195L/L145V/L154G (V13)。催化三联体D192-H230-S110用红色表示, 氧阴离子孔用蓝色表示, 残留物N194和L195用黄色表示, 环6用紫色表示, α 10螺旋用橙色表示, α 7螺旋用黄色表示。SRL-I194N/V195L中的残基为灰色 (L145、L154), 突变的残基为青色。相互作用和氧阴离子稳定的H键用灰色虚线表示。V291和L149的距离用黑色虚线标记。

at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.03.020>.

References

- [1] Hamad B. The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(9):675–6. doi: 10.1038/nrd3267. PMID:20811374
- [2] Ramesh P, Harini T, Fadnavis NW. Efficient resolution of *cis*-(±)-dimethyl 1-acetyl piperidine-2, 3-dicarboxylate with soluble *Candida antarctica* lipase B (CAL B). *Org Process Res Dev* 2015;19(1):296–301. doi:10.1021/op5003424.
- [3] Borrelli GM, Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci* 2015;16(9):20774–840. doi:10.3390/ijms160920774. PMID:26340621
- [4] Filho DG, Silva AG, Guidini CZ. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103(18): 7399–423. doi:10.1007/s00253-019-10027-6. PMID:31375880
- [5] Xu Y, Wang X, Liu X, Li X, Zhang C, Li W, et al. Discovery and development of a novel short-chain fatty acid ester synthetic biocatalyst under aqueous phase from *Monascus purpureus* isolated from Baijiu. *Food Chem* 2021;338:128025. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128025. PMID:32927200
- [6] Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, Yamuna Rani K, Sridhar S, Mehtab V, et al. Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnol Prog* 2018;34(1):5–28. doi:10.1002/btpr.2581. PMID:29086509
- [7] Li Y, Wang A, Shen Y, Zhang P. Convenient enzymatic resolution of *cis*-6-benzyltetrahydro-1*H*-pyrrolo[3,4-*b*]pyridine-5,7(6*H*,7*aH*)-dione using lipase to prepare the intermediate of moxifloxacin. *J Mol Catal B Enzym* 2014;110:178–83. doi:10.1016/j.molcatb.2014.10.009.
- [8] Shah A, Yameen MA, Fatima N, Murtaza G. Chemical synthesis of chitosan/silver nanocomposites films loaded with moxifloxacin: their characterization and potential antibacterial activity. *Int J Pharm* 2019;561:19–34. doi:10.1016/j.ijpharm.2019.02.029. PMID:30817984
- [9] Shen JW, Qi JM, Zhang XJ, Liu ZQ, Zheng YG. Significantly increased catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B for the resolution of *cis*-(±)-dimethyl 1-acetyl piperidine-2, 3-dicarboxylate. *Catal Sci Technol* 2018; 8(18): 4718–25. doi:10.1039/C8CY01340C.
- [10] Reetz MT, Jaeger KE. Enantioselective enzymes for organic synthesis created by directed evolution. *Chemistry* 2000;6(3):407–12. doi:10.1002/(SICI)1521-3765(20000204)6:3<407::AID-CHEM407>3.0.CO;2-Y. PMID:10747404
- [11] Böttcher D, Bornscheuer UT. Protein engineering of microbial enzymes. *Curr Opin Microbiol* 2010; 13(3): 274–82. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.010. PMID: 20171138
- [12] Cai X, Jiang H, Zhang T, Jiang B, Mu W, Miao M. Thermostability and specific-activity enhancement of an arginine deiminase from *Enterococcus faecalis* SK23.001 via semirational design for L-citrulline production. *J Agric Food Chem* 2018; 66(33): 8841–50. doi: 10.1021/acs.jafc.8b02858. PMID: 30047723
- [13] Krohl PJ, Ludwig SD, Spangler JB. Emerging technologies in protein interface engineering for biomedical applications. *Curr Opin Biotechnol* 2019;60:82–8. doi:10.1016/j.copbio.2019.01.017. PMID:30802788
- [14] Qu G, Li A, Acevedo-Rocha CG, Sun Z, Reetz MT. The crucial role of methodology development in directed evolution of selective enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl* 2020;59(32):13204–31. doi:10.1002/anie.201901491. PMID: 31267627
- [15] Shen JW, Cai X, Dou BJ, Qi FY, Zhang XJ, Liu ZQ, et al. Expression and characterization of a CALB-type lipase from *Sporisorium reilianum* SRZ2 and its potential in short-chain flavor ester synthesis. *Front Chem Sci Eng* 2020;

- 14(5):868–79. doi:10.1007/s11705-019-1889-x.
- [16] Xu J, Cen Y, Singh W, Fan J, Wu L, Lin X, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters. *J Am Chem Soc* 2019; 141(19): 7934–45. doi: 10.1021/jacs.9b02709. PMID:31023008
- [17] Verma S, Choudhary RN, Kanadje AP, Banerjee UC. Diversifying arena of drug synthesis: in the realm of lipase mediated waves of biocatalysis. *Catalysts* 2021; 11(11):1328. doi:10.3390/catal11111328.
- [18] Li D, Chen X, Chen Z, Lin X, Xu J, Wu Q. Directed evolution of lipase A from *Bacillus subtilis* for the preparation of enantiocomplementary *sec*-alcohols. *Green Syn Catal* 2021;2(3):290–4. doi:10.1016/j.gresc.2021.07.003.
- [19] Zhang Y, Zhu Q, Fei Z, Lin X, Xia B, Wu Q. Stereoselectivity-tailored chemo-enzymatic synthesis of enantiocomplementary poly (ω -substituted- δ -valerolactone) enabled by engineered lipase. *Eur Polym J* 2019; 119: 52–60. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.07.006.
- [20] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018;46(W1):W296–303. doi:10.1093/nar/gky427. PMID: 29788355
- [21] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009; 30(16): 2785–91. doi: 10.1002/jcc.21256. PMID:19399780
- [22] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 1996;14(1):33–8. doi:10.1016/0263-7855(96)00018-5. PMID:8744570
- [23] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010;31(2):455–61. PMID:19499576.
- [24] Kutzner C, Páll S, Fechner M, Esztermann A, de Groot BL, Grubmüller H. More bang for your buck: improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *J Comput Chem* 2019;40(27):2418–31doi:10.1002/jcc.26011. PMID:31260119
- [25] Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 2010;78(8):1950–8. doi:10.1002/prot.22711. PMID:20408171
- [26] ConsortiumUniProt. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* 2015;43(D1):D204–12. PMID:25348405.
- [27] Uppenberg J, Hansen MT, Patkar S, Jones TA. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 1994;2(4):293–308. doi:10.1016/S0969-2126(00)00031-9. PMID:8087556
- [28] Cen Y, Singh W, Arkin M, Moody TS, Huang M, Zhou J, et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nat Commun* 2019;10(1):3198. doi:10.1038/s41467-019-11155-3. PMID:31324776
- [29] Stauch B, Fisher SJ, Cianci M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J Lipid Res* 2015;56(12):2348–58. doi:10.1194/jlr.M063388. PMID:26447231
- [30] Sumbalova L, Stourac J, Martinek T, Bednar D, Damborsky J. HotSpot Wizard 3.0: web server for automated design of mutations and smart libraries based on sequence input information. *Nucleic Acids Res* 2018;46(W1):W356–62. doi: 10.1093/nar/gky417. PMID:29796670
- [31] Verma S, Meghwanshi GK, Kumar R. Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie* 2021;182:23–36. doi: 10.1016/j.biochi.2020.12.027. PMID:33421499
- [32] Stephens PJ, Devlin FJ, Chabalowski CF, Frisch MJ. *Ab initio* calculation of vibrational absorption and circular dichroism spectra using density functional force fields. *J Phys Chem* 1994;98(45):11623–7. doi:10.1021/j100096a001.
- [33] Błaszczak J, Kielbasiński P. Quarter of a century after: a glimpse at the conformation and mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. *Crystals* 2020; 10(5):404. doi:10.3390/cryst10050404.
- [34] Ding X, Tang XL, Zheng RC, Zheng YG. Identification and engineering of the key residues at the crevice-like binding site of lipases responsible for activity and substrate specificity. *Biotechnol Lett* 2019; 41(1): 137–46. doi: 10.1007/s10529-018-2620-6. PMID:30392017
- [35] Sánchez DA, Tonetto GM, Ferreira ML. *Burkholderia cepacia* lipase: a versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnol Bioeng* 2018;115(1):6–24. doi:10.1002/bit.26458. PMID:28941272
- [36] Luan B, Zhou R. A novel self-activation mechanism of *Candida antarctica* lipase B. *Phys Chem Chem Phys* 2017; 19(24): 15709–14. doi: 10.1039/C7CP02198D. PMID:28589990
- [37] Zisis T, Freddolino PL, Turunen P, van Teeseling MC, Rowan AE, Blank KG. Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: combined evidence from experiment and simulation. *Biochemistry* 2015;54(38):5969–79. doi:10.1021/acs.biochem.5b00586. PMID:26346632