

# TLL 脂肪酶 C 末端修饰对其底物选择性的调节作用

谭熙钰<sup>1</sup>, 赵泽鑫<sup>2</sup>, 杨博<sup>2</sup>, 王永华<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本研究以甘油三酯脂肪酶 TLL 为研究对象, 将偏甘油酯脂肪酶 AOL 的 C 末端(Y246-H266)与其 C 末端(I241-P256)替换, 获得突变体 TLL\_CC, 并在毕赤酵母 X-33 中成功地进行了重组表达。乳化橄榄油的水解实验显示, C 末端的置换不影响 TLL 脂肪酶的 pH 特性, 但是 TLL\_CC 的最适反应温度较 TLL 脂肪酶下降了 15 °C。这可能意味着长的 C 末端可以增加酶分子整体的柔性, 进而降低其最适反应温度。三油酸甘油酯的水解实验发现, TLL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 反应体系中残留的三酯分别为 28.31% 和 48.12%。而酯化合成甘油酯实验显示, TLL\_CC 催化的反应体系中 TAG 生成量仅为野生型的 56.67%, 但 DAG 的生成量却相同。上述研究表明, TLL\_C 末端的这种置换明显减弱了 TLL 脂肪酶水解和合成 TAG 的能力, 但并不影响其合成 DAG 的能力。这说明 C 末端的氨基酸替换可能对脂肪酶 TLL 的底物选择性起到调节作用。

**关键词:** 甘油三酯脂肪酶; 偏甘油酯脂肪酶; 底物选择性; C 末端

文章编号: 1673-9078(2018)11-21-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.004

## Regulation of Substrate Selectivity of a Lipase from *Thermomyces lanuginosus* by C-terminus Modification

TAN Xi-yu<sup>1</sup>, ZHAO Ze-xin<sup>2</sup>, YANG Bo<sup>2</sup>, WANG Yong-hua<sup>1</sup>

(1.School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2.School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** In this study, the C-terminus (I241-P256) of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) was replaced by the corresponding region of *Aspergillus oryzae* lipase (Y246-H266) through site-directed substitution, and then the mutant of TLL, named TLL\_CC, was successfully expressed in *P. pastoris* strain X-33. The hydrolysis experiments of emulsified olive oil indicated that the substitution for C-terminus of TLL led to a reduction of 15 °C in optimum reaction temperature but didn't change the pH-dependent profile of the activity, implying that long C-terminus may increase the overall flexibility of enzymes and reduce the optimum reaction temperature. Hydrolysis experiments of triolein showed that the TAG substrate remained 28.31% and 48.12% in reaction systems of TLL lipase and mutant TLL\_CC, respectively. On the other hand, esterification reactions showed that the yield of TAG produced by TLL\_CC was 56.67% of TLL, while the same amount of DAG was obtained. The results indicated that the substitution of C-terminus of TLL distinctly decreased its ability to hydrolyze or produce TAG, but did not affect its ability to synthesize DAG. Thus, the substitution of amino acids on C-terminus may play important role in regulating substrate selectivity of TLL.

**Key words:** triacylglycerol lipase; mono- and diacylglycerol lipase; substrate selectivity; C-terminus

自然界中存在的绝大多数脂肪酶(EC 3.1.1.3)能够催化水解甘油三酯, 但是有少量的脂肪酶被鉴定为不具备接纳甘油三酯(TAG)底物但能够催化水解甘油二酯和单酯, 这类脂肪酶被称为偏甘油酯脂肪酶<sup>[1-4]</sup>。因其具有特殊的底物选择性, 所以偏甘油酯脂肪酶在食品工业和医药保健品生产等领域有广阔的应用空间。

收稿日期: 2018-03-03

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017A050503001)

作者简介: 谭熙钰 (1993-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 王永华 (1973-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品酶工程

例如, 使用偏甘油酯脂肪酶生产高纯度甘油二酯(DAG)<sup>[5,6]</sup>, 食用乳化剂<sup>[7]</sup>, 共轭亚油酸酯<sup>[8]</sup>, 生物柴油<sup>[9]</sup>等。虽然偏甘油酯脂肪酶已经被广泛使用, 但是引起其特殊底物选择性的分子机制并不清楚。

脂肪酶的 C 末端常常与其功能有密切关系。Barbara Koch 等<sup>[10]</sup>人发现酵母甘油三酯脂肪酶 Tgl3p 的 C 末端具有结合脂质底物和维持整体结构稳定的功能。Hung Kuo-Sheng 等<sup>[11]</sup>人通过比较来源于 *Candida rugosa* 的同源脂肪酶 LIP1-LIP4 的序列和功能发现, C 末端可以调节酶的活力、热稳定性及界面特性。Chen

C.K.等<sup>[12]</sup>人通过分析古菌 *Archaeoglobus fulgidus* 脂肪酶与多种底物的复合物结构发现,其 C 末端能够帮助结合长链的脂肪酸从而调节脂肪酶的链长选择性。Broedl UC 等人<sup>[13]</sup>也认为内皮脂肪酶的 C 末端对其底物偏好性起到了调节作用。由此可见,脂肪酶的 C 末端的变化能够对其功能产生重要的影响。

现在已经被鉴定并报道的偏甘油酯脂肪酶,几乎都属于RML真菌脂肪酶家族。该脂肪酶家族既包括了大量的甘油三酯脂肪酶,如被广泛应用的米黑根毛霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase, RML),疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶(*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL)和米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae* lipase, ROL)等,也拥有沙门柏干酪青霉脂肪酶(*Penicillium camemberti* lipase, PCL),米曲霉脂肪酶(*Aspergillus oryzae* lipase, AOL),马来色球菌(*Malassezia globosa*)脂肪酶LIP和MgMDL2等偏甘油酯脂肪酶。这些脂肪酶基因虽然来源于不同的真菌,但是它们都具有一定的序列和空间相似性<sup>[14]</sup>。同时,大量RML家族脂肪酶的晶体结构已经被解析<sup>[15-17]</sup>,这为研究偏甘油酯脂肪酶特异的底物选择性的分子基础提供了可能。本研究将通过序列比对和结构分析的方法发现甘油三酯脂肪酶和偏甘油酯脂肪酶的差异,再以甘油三酯脂肪酶TLL为模板,将不保守的偏甘油酯脂肪酶AOL的C端与TLL进行置换,考察并总结酶突变体的生化特性变化规律,从而揭示调节脂肪酶底物选择性的分子基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料与试剂

重组疏棉状嗜热丝孢菌 TLL 脂肪酶质粒 PGAPZαA-TLL由本实验室构建并保存。PrimeSTAR高保真DNA聚合酶和限制性内切酶DpnI购于大连宝生物有限公司(TaKaRa);酵母提取物和蛋白胨购自英国Oxoid公司;突变引物、博来霉素和BCA蛋白定量试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;三油酸甘油酯和油酸购于Sigma-Aldrich公司;其他试剂均为市售国产分析纯。主要仪器有大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司PCR仪、美国Waters 1525高效液相色谱仪和瑞士

Tecan公司Infinite F50酶标仪。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 突变体 TLL\_CC 的构建

基于 QuikChange<sup>TM</sup> PCR 扩增的突变方法将 AOL 的 C 端置换至 TLL。考虑到突变的片段太长,先合成了四条短引物,序列见表 1,将合成的短引物等体积混合以扩增出全长突变引物 5'-GTGACCCGAAACGATATTGTCAAATTTGAAGGTTATGTAAATTTAAGGGCAATACAGGTACATCCGGAGGTTTACCTGATTTGTTGGCTTTTCATGCACATTTGTGGTATTGGGTAAATTGGGACA-3'。扩增全长突变引物的反应体系见表 2。

表 2 全长突变引物扩增的反应体系

Table 2 Reaction system for amplifying full-length primer of mutant

试剂	体积/μL
短引物 1	0.5
短引物 2	0.5
短引物 3	0.5
短引物 4	0.5
2×PrimeSTAR	10
H <sub>2</sub> O	8
总体系	20

PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s; 58 °C 退火 15 s; 72 °C 延伸 10 s, 20 个循环; 72 °C 1 min。再以 PGAPZαA-TLL 为模板,上一步 PCR 扩增产物为引物扩增出置换 C 末端的突变体质粒 PGAPZαA-TLL\_CC, PCR 反应体系见表 3。

表 3 突变体质粒扩增的反应体系

Table 3 Reaction system for amplifying plasmid of mutant

试剂	体积/μL
质粒模板	1
引物	1
2×PrimeSTAR	12.5
H <sub>2</sub> O	10.5
总体系	25

表 1 TLL 突变体的短引物序列

Table 1 Short primers for TLL mutant

引物名称	引物序列
短引物 1	5'-GTGACCCGAAACGATATTGTC-3'
短引物 2	5'-CCTGTATTGCCCTTAAATTAACATAACCTTCAATTTTGACAATATCGTTTCGGGTCAC-3'
短引物 3	5'-ATGTAAATTTTAAGGGCAATACAGGTACATCCGGAGGTTTACCTGATTTGTTGGCTTTT-3'
短引物 4	5'-TGTCCCAATTAACCCAAAATACCACAAATGTGCATGAAAAGCCAACAAATCAGGTAAAC-3'

PCR 反应程序: 98 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 58 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 4 min, 31 个循环; 72 °C 10 min。

通过限制性内切酶 DpnI 对模板进行消化, 将突变体质粒转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 完成突变体的构建。突变体质粒通过 DNA 测序验证, 电转至毕赤酵母 X-33 中表达。

### 1.2.2 TLL 脂肪酶及突变体的表达与纯化

将种子液按 5% 的接种量接至 500 mL YPD 培养基中, 30 °C, 200 r/min 培养 72 h。将发酵液在 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min 除去菌体, 上清液经过 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后, 用 10000 u 切向流超滤膜包浓缩并换盐至 pH 8.0 的 20 mM Tris-HCl 缓冲液。使用 Q 阴离子交换(Q-Sepharose FF)层析纯化, 以 pH 8.0 含 0.15 M NaCl 20 mM Tris-HCl 缓冲液洗脱, 得到高纯度蛋白。

### 1.2.3 温度和 pH 对 TLL 脂肪酶及突变体活力的影响

TLL 脂肪酶及突变体的水解活力使用乳化橄榄油法<sup>[18]</sup>测定。在 100 mL 的反应瓶中分别加入 4 g 橄榄油乳化和 5 g 缓冲液。对照组先在反应瓶中加入 10 mL 95% 乙醇, 再将实验组和对照组放入一定温度的水浴摇床预孵育。待孵育 5 min 后, 将 1 mL 酶液分别加入到对照组和实验组中反应 5 min, 再迅速往实验组中加入 10 mL 95% 乙醇终止反应。以 1% 酚酞为指示剂, 用 0.05 mol/L NaOH 滴定的方法确定反应瓶中混合物的酸价, 以此计算酶活。

在确定温度对脂肪酶活力的试验中, 水浴摇床设置的温度分别为 25、30、35、40、45、50、55 和 60 °C, 转速为 250 r/min。反应体系中使用的缓冲液为 0.1 M pH 7.0 的磷酸盐缓冲液。

在确定 pH 对脂肪酶活力的试验中, 水浴摇床设置的温度为 35 °C, 转速为 250 r/min。反应体系中使用的缓冲液为 pH 分别为 4、5(0.05 M 柠檬酸缓冲液)、6、7、8(0.1 M 磷酸盐缓冲液)和 9(0.1 M Tris-HCl 缓冲液)。

### 1.2.4 TLL 脂肪酶及突变体的底物选择性

#### 1.2.4.1 甘油三酯水解实验

在 10 mL 具塞反应瓶中加入 1 g 三油酸甘油酯, 再加入 20 mM pH 7.0 磷酸盐缓冲液 200  $\mu$ L 和 50 个水解酶活单位的 TLL 脂肪酶或其突变体 TLL\_CC 酶液于 35 °C 下反应 72 h。分别在 3、6、9、12、24、36、48、60 和 72 h 取样, 每次取 30  $\mu$ L, 加入 970  $\mu$ L 含 0.5 g 无水硫酸钠溶解。样品经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤待测。

#### 1.2.4.2 酯化实验

在 10 mL 的具塞反应瓶中加入 2 g 油酸和 0.5 g 甘

油, 再加入 2% (W/V) 的 20 mM pH 7.0 磷酸盐缓冲液和含 2 mg 的 TLL 脂肪酶或其突变体 TLL\_CC 的冻干粉于 35 °C 下反应 72 h。分别在 3、6、9、12、24、36、48、60 和 72 h 取样, 每次取 30  $\mu$ L, 加入 970  $\mu$ L 含 0.5 g 无水硫酸钠的流动相溶解。样品经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后待检测。

#### 1.2.4.3 HPLC 检测油脂成分

高效液相检测分析使用色谱柱, Phenomenex Luna 5 u silico (2) 100 Å (250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相为正己烷-异丙醇-甲酸(体积比 15:1:0.003); 流速, 1.0 mL/min; 柱箱温度, 30 °C; 检测器温度, 35 °C; 进样量, 10  $\mu$ L。根据标样保留时间定性, 记录产物中各物质峰面积。

#### 1.2.5 同源建模

以 TLL 脂肪酶的开放构象(PDB code:1EIN)为模板, 使用 MODELLER 软件构建突变体 TLL\_CC 和 AOL 的开放构象。使用 CHIMERA 软件在真空中对各构象进行能量最小化。所有的结构图像由 PYMOL 制作。

#### 1.2.6 数据统计分析

每组实验均设三个平行并重复三次, 利用 GraphPad 软件对实验数据进行方差分析以及作图。当  $p < 0.05$  时, 差异性显著。

## 2 结果与讨论

### 2.1 甘油三酯脂肪酶与偏甘油酯脂肪酶的结构分析

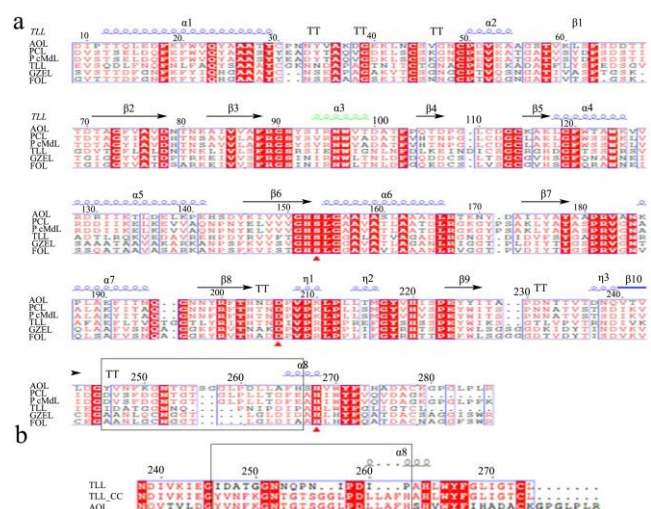


图 1 RML 脂肪酶家族成员的多序列比对 (a) 及 TLL 脂肪酶 C 末端替换区 (b)

Fig.1 The multiple sequence alignment of RML family lipase (a) and the exchanged region in C-terminus of TLL lipase (b)

如图 1a 所示, TLL 脂肪酶除了与两个甘油三酯脂肪酶 GZEL (玉米赤霉脂肪酶, *Gibberella zeae* lipase) 和 FOL (尖孢镰刀菌脂肪酶, *Fusarium oxysporum* lipase) 分别有 44% 和 43% 的序列一致性外, 还分别与偏甘油酯脂肪酶 PCL、PcMdL (圆弧青霉脂肪酶, *Penicillium cyclopium* lipase) 和 AOL 有 42%、42% 和 40% 的序列一致性。虽然这些 RML 家族脂肪酶表现出较高的同源性, 但是在 C 末端均表现出了差异性。偏甘油酯脂肪酶在图示区域中相对于甘油三酯脂肪酶有更多氨基酸的插入。

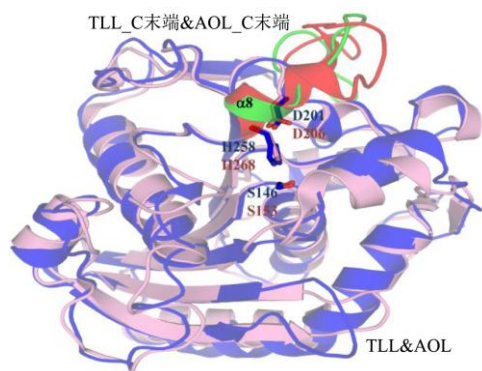


图 2 TLL 脂肪酶和 AOL 脂肪酶的结构叠合

Fig.2 The structural superimposition of TLL and AOL lipases

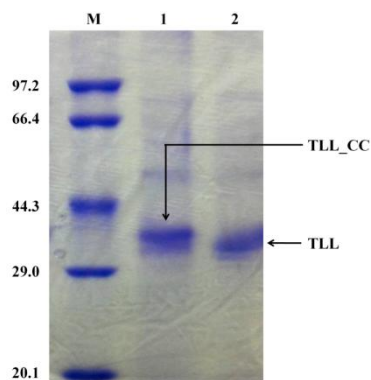


图 3 TLL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 的纯化电泳图

Fig.3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of the purification of TLL and TLL\_CC

注: M 表示 Marker; 1 表示 TLL\_CC 纯化蛋白; 2 表示 TLL 纯化蛋白。

另一方面, 通过同源建模获得的 AOL 脂肪酶模型与 TLL 脂肪酶的晶体结构的叠合(图 2)表明, 这两个具有不同底物选择性的脂肪酶的整体结构有很好的重叠性(RMSD=0.68), 仅在 C 末端处出现了大的不重叠区, 且该区域与序列比对中的氨基酸插入区吻合。为了探究该区域的差异与 RML 家族脂肪酶的底物选择性的关系, 我们构建了 TLL 脂肪酶的突变体, 将 AOL 脂肪酶的 C 末端(Y246-H266)替换 TLL 脂肪酶的 C 末端(I241-P256), 该突变体被命名为 TLL\_CC(图

1b)。野生型 TLL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 通过 Q 柱纯化获得高纯度蛋白, SDS-PAGE 电泳图见图 3。TLL 脂肪酶的分子量大小约为 35 ku, 而 TLL\_CC 的分子量略大于 TLL 脂肪酶, 约为 36 ku。经纯化后的 TLL 脂肪酶及突变体 TLL\_CC 在图中对应分子量大小处有明显条带, 且蛋白纯度较高。

## 2.2 TLL 和 TLL\_CC 脂肪酶的最适反应温度和 pH

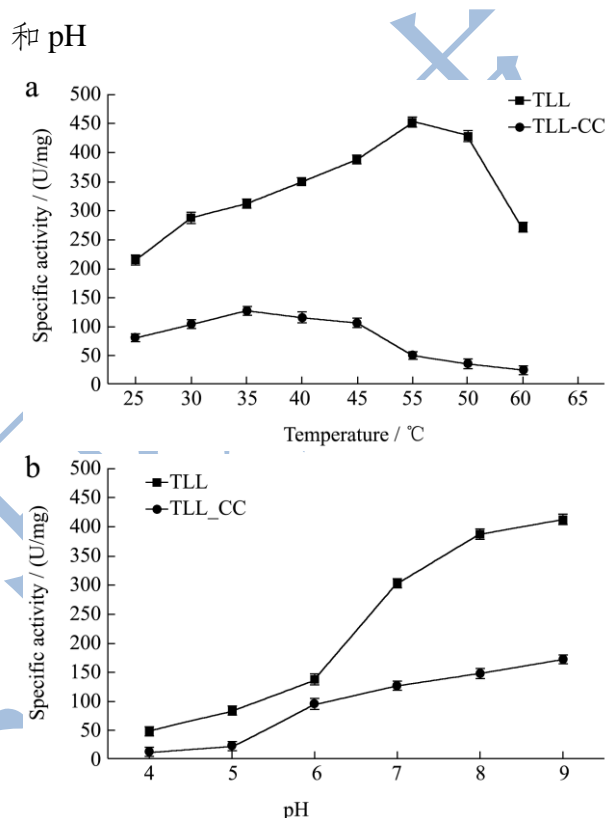


图 4 温度(a)和 pH(b)对 TLL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 水解活力的影响

Fig.4 Effect of temperature (a) and pH (b) on the hydrolytic activity of TLL lipase and mutant TLL\_CC

从图 4a 可以看出 TLL 和 TLL\_CC 脂肪酶在 pH 7.0 下的活力都随反应温度的变化呈现出抛物线的变化趋势。TLL 脂肪酶的最适温度为 50 °C, 而突变体 TLL\_CC 的最适温度为 35 °C。从图 4b 则可以看出 TLL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 在 35 °C、pH 4~9 下的活力都随 pH 的增加呈现出递增的趋势。由此可见, C 末端的替换使 TLL 脂肪酶的最适反应温度下降了 15 °C, 与 AOL 脂肪酶接近<sup>[19]</sup>。这可能是因为在末端形成了更长且柔性更大的无规卷曲(图 2)。众所周知, 酶在催化反应的时候需要一定的柔性, 使之与底物稳定的结合, 而较高的温度可以提供给酶分子更多的柔性。因此当酶分子本身具有较高的柔性时则仅需要较低的温度就能使酶的催化效果达到最佳。虽然

该突变体的最适反应温度发生了变化, 但是该区域的替换并没有太多的带电氨基酸参与(图 1b 中 TLL 序列显示仅 D247 为带电氨基酸), 因此不会对 TLL 脂肪酶的电解状态产生太大的影响, 从而使其 pH 特性并没有发生明显的变化。

### 2.3 TLL 和 TLL\_CC 脂肪酶的底物选择性

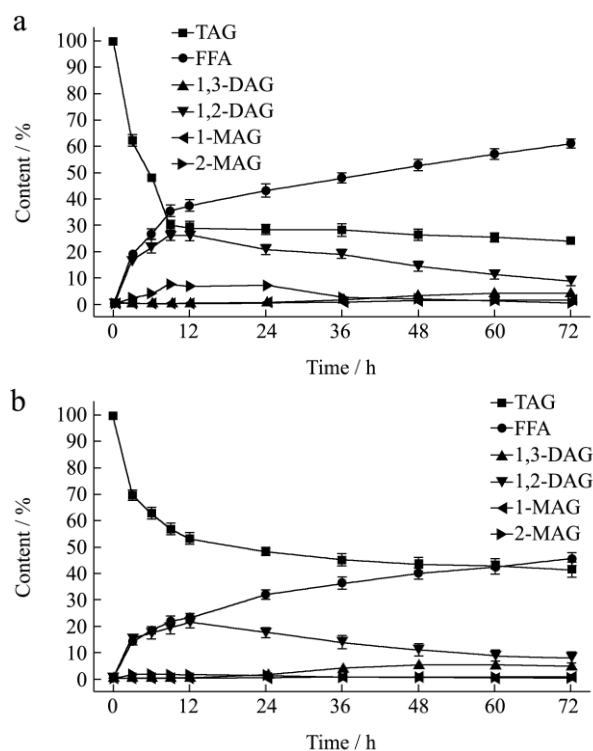


图5 TLL 脂肪酶(a)和突变体 TLL\_CC(b)催化三油酸甘油酯的水解反应

Fig.5 Time course of hydrolysis of triolein by TLL lipase (a) and mutant TLL\_CC (b)

甘油三酯(TAG)的水解反应在 35 °C、pH 7.0 的条件下进行, 水解产物包含 1,3-甘油二酯(1,3-DAG)、1,2-甘油二酯(1,2-DAG)、1-甘油单酯(1-MAG)、2-甘油单酯(2-MAG)以及游离脂肪酸(FFA)。结果如图 5 所示, 当反应在 24 h 达到平衡时, TLL 脂肪酶催化的水解反应中甘油三酯残余 28.30%, 仅为 TLL\_CC 组剩余的 TAG 的 58.81%, 表明替换 C 端后水解甘油三酯能力变弱。但 TLL 脂肪酶反应体系中残留的甘油二酯(DAG)比 TLL\_CC 多 2.27%。

而在相同温度和 pH 的反应条件下甘油和油酸的酯化反应中, TLL 脂肪酶和突变体都在 48 h 到达平衡(图 6)。此时, 两组反应中, TLL 脂肪酶催化生成的 TAG 含量为突变体 TLL\_CC 的 1.74 倍, 但其催化生成的 DAG 却与突变体 TLL\_CC 相当, 都约为 38.90%, 表明替换 C 端后酯化合成甘油三酯的能力也相应变弱, 而甘油二酯的合成能力未受影响。以上实验结果

显示, C 末端的替换导致 TLL 脂肪酶接纳 TAG 型底物的能力减弱, 但是依旧保留了对 DAG 型底物的催化能力。这也可以解释为什么 TLL 脂肪酶在 pH 7.0 时的最佳水解活力是突变体 TLL\_CC 的 3.57 倍, 但是它们催化甘油和油酸酯化生成 DAG 的能力却相差无几。

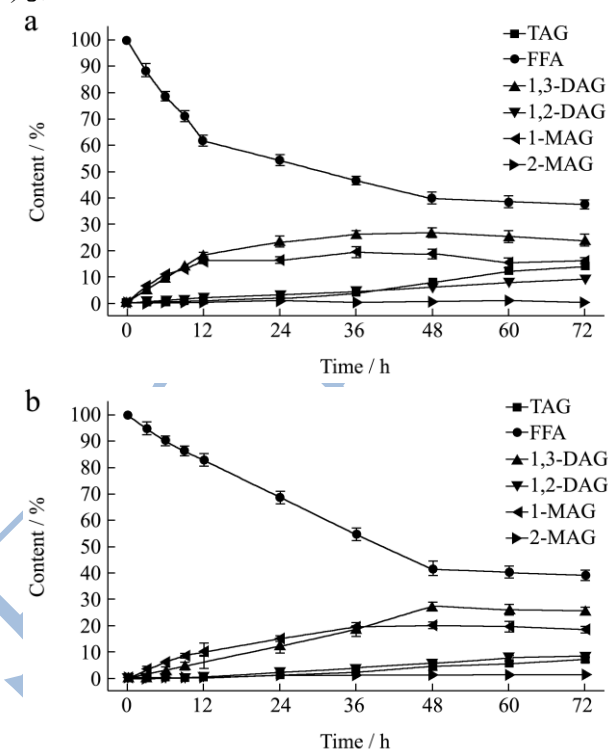


图6 TLL 脂肪(a)和突变体 TLL\_CC(b)催化甘油和油酸的酯化反应

Fig.6 Time course of esterification of glycerol with oleic acid by TLL lipase (a) and mutant TLL\_CC (b)

### 2.4 底物选择性调节的分子机制

为了进一步探究 C 末端影响 TLL 脂肪酶底物选择性的微观原因, 构建了突变体 TLL\_CC 的开放构象。如图 7a 所示, 将 TLL 脂肪酶、AOL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 的空间结构叠加后发现 AOL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 的 C 末端的 262 和 257 位点较 TLL 脂肪酶在螺旋  $\alpha 8$ (图 2)的 N 端多出了一个疏水侧链的亮氨酸覆盖在催化活性中心上方, 而 TLL 脂肪酶的 255 位的异亮氨酸在 AOL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 中都被苯丙氨酸取代。在 TLL 脂肪酶中, 覆盖在其催化口袋上的 I255 与 W97 之间的距离为 9.9 Å(图 7b)。而 AOL 脂肪酶 C 末端的 L262 和 F265 与盖子上的 W89 之间的距离为 7.5 Å 和 8.0 Å, 比突变体 TLL\_CC 的 L257 和 F260 与 W97 之间的距离分别少 1.3 Å 和 1.1 Å(图 7c 和 d)。由此可见, AOL 脂肪酶由于 L262、F265 与 W89 的位阻效应无法接纳体积较大的 TAG 型底物

而只能接纳 DAG 型底物。相较而言, TLL 脂肪酶不存在这样的位阻效应, 其催化中心的最小宽度都已经接近 10 Å, 这可以使其顺利地接纳 TAG 型底物。虽然将 AOL 脂肪酶的 C 末端置换到 TLL 脂肪酶上能够加大催化口袋的位阻效应, 但是由于整体结构的差异性, 突变体 TLL\_CC 在催化口袋的位阻比 AOL 脂肪酶小得多。这使得突变体 TLL\_CC 依然保留一定的 TLL 脂肪酶催化 TAG 型底物的能力, 同时没有影响其接纳 DAG 底物的本能。

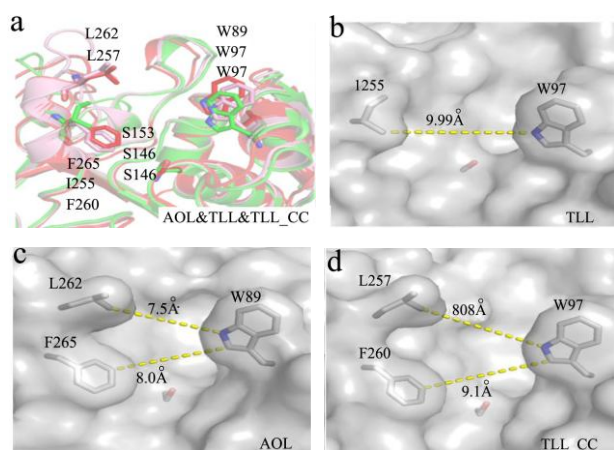


图 7 TLL 脂肪酶、AOL 脂肪酶和突变体 TLL\_CC 的叠合图 (a) 及 TLL 脂肪酶 (b), AOL 脂肪酶 (c) 和突变体 TLL\_CC (d) 的表面展示图

Fig.7 The superimposition of TLL lipase, AOL lipase and mutant TLL\_CC (a) and surface representation of the catalytic pockets from TLL lipase (b), AOL lipase (c) and mutant TLL\_CC (d)

### 3 结论

甘油二酯是一种具有保健功能的新型食用油脂, 而单甘酯 (MAG) 及二酯单酯混合物是被广泛应用于食品工业中的表面活性剂, 这些脂质产品都可以由偏甘油酯脂肪酶高效合成<sup>[20,21]</sup>。但是, 偏甘油酯脂肪酶的数量相较于甘油三酯脂肪酶而言却十分有限。本文通过比较 RML 脂肪酶家族中的甘油三酯脂肪酶和偏甘油酯脂肪酶的序列和空间结构, 发现了这两类酶的本质差异在于靠近催化三联体中组氨酸的 C 末端。通过置换甘油三酯脂肪酶 TLL 的 C 末端并考察野生型 TLL 和突变体 TLL\_CC 的催化特性, 我们发现突变体完全保留了野生型 TLL 脂肪酶接纳 DAG 型底物的能力, 但是催化 TAG 型底物的活力大幅下降。这使得突变体 TLL\_CC 更像是一个偏甘油酯脂肪酶。通过结构分析发现, 当 C 末端的 I255 替换成 F 并且在螺旋  $\alpha 8$  的 N 端上引入一个新的疏水氨基酸 L 可以增加催化口袋的位阻效应, 减小催化口袋的体积, 从而调节脂肪

酶的底物选择性。本研究论证了 TLL 脂肪酶的 C 末端序列或结构对其底物选择性的调节作用, 并构建了一种能够应用于工业生成食用型甘油二酯和甘油酯型乳化剂的新型脂肪酶。

### 参考文献

- [1] Yamaguchi S, Mase T, Takeuchi K. Cloning and structure of the mono- and diacylglycerol lipase-encoding gene from *Penicillium camembertii* U-150 [J]. *Gene*, 1991, 103(1): 61-67
- [2] Tsuchiya A, Nakazawa H, Toida J, et al. Cloning and nucleotide sequence of the mono- and diacylglycerol lipase gene (mdlB) of *Aspergillus oryzae* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 1996, 143(1): 63-67
- [3] Xu H, Lan D, Yang B, et al. Biochemical properties and structure analysis of a DAG-Like lipase from *Malassezia globosa* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(3): 4865-4879
- [4] Xu T, Liu L, Hou S, et al. Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malassezia globosa* reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity [J]. *Journal of Structural Biology*, 2012, 178(3): 363-369
- [5] Wang W F, Li T, Qin X L, et al. Production of lipase SMG1 and its application in synthesizing diacylglycerol [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2012, 77(6): 87-91
- [6] Li X, Li D, Wang W, et al. Immobilization of SMG1-F278N lipase onto a novel epoxy resin: Characterization and its application in synthesis of partial glycerides [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2016, 133: 154-160
- [7] Huang J, Yang Z, Guan F, et al. A novel mono- and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(12): 1899-1904
- [8] Watanabe Y, Yamauchi-Sato Y, Nagao T, et al. Production of MAG of CLA by esterification with dehydration at ordinary temperature using *Penicillium camembertii* lipase [J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2005, 82(9): 619-623
- [9] Shinji H, Takao N, Sriappareddy T, et al. Use of mono- and diacylglycerol lipase as immobilized fungal whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2009, 58(1): 93-97
- [10] Koch B, Schmidt C, Ploier B, et al. Modifications of the C terminus affect functionality and stability of yeast

- triacylglycerol lipase Tgl3p [J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(28): 19306-19316
- [11] Hung K S, Chen S Y, Liu H F, et al. C-terminal region of *Candida rugosa* lipases affects enzyme activity and interfacial activation [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2011, 59(10): 5396-5401
- [12] Chen C K, Lee G C, Ko T P, et al. Structure of the alkalohyperthermophilic *Archaeoglobus fulgidus* lipase contains a unique C-terminal domain essential for long-chain substrate binding [J]. Journal of Molecular Biology, 2009, 390(4): 672-685
- [13] Broedl U C, Jin W, Fuki I V, et al. Structural basis of endothelial lipase tropism for HDL [J]. FASEB J, 2004, 18(15): 1891-1893
- [14] Yuan D, Wu Z, Wang Y. Evolution of the diacylglycerol lipases [J]. Progress in Lipid Research, 2016, 64: 85-97
- [15] Brzozowski A M, Savage H, Verma C S, et al. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase [J]. Biochemistry, 2000, 39(49): 15071-15082
- [16] [Derewenda U, Brzozowski A M, Lawson D M, et al. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase [J]. Biochemistry, 1992, 31(5): 1532-1541
- [17] Tang Q, Popowicz G M, Wang X, et al. Lipase-driven epoxidation is a two-stage synergistic process [J]. Chemistryselect, 2016, 1(4): 836-839
- [18] Yang B, Wang Y H, Yang J G. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2006, 83(7): 653-658
- [19] Toida J, Kondoh K, Fukuzawa M K, et al. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae* [J]. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 1995, 59(7): 1199-1203
- [20] Zhang Z, Ma X, Huang H, et al. Enzymatic production of highly unsaturated monoacylglycerols and diacylglycerols and their emulsifying effects on the storage stability of a palm oil based shortening system [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2017, 94: 1-14
- [21] Feltes M M C, Oliveira D D, Block J M, et al. The production, benefits, and applications of monoacylglycerols and diacylglycerols of nutritional interest [J]. Food & Bioprocess Technology, 2013, 6(1): 17-35