

枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 的生物信息学分析

黎菁菁^{1,2}, 赖昕珏², 李鑫尧², 马俊炜², 余铭怡², 罗佳伟², 陈胤熹², 余洁婷², 郑少鹏², 郑敦锦^{1,2},
曹诗林^{1,2*}, 陈宛涓³

(1. 佛山科学技术学院广东省食品智能制造重点实验室, 广东佛山 528000) (2. 佛山科学技术学院食品科学与工程学院, 广东佛山 528000) (3. 佛山科学技术学院材料科学与氢能学院, 广东佛山 528000)

摘要: 该研究应用生物信息学方法对枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 进行分析, 旨在为 LipA 的后续研究奠定一定的理论基础。采用一系列在线网站或软件对 LipA 的一级结构、亲疏水性、基本特性、二级结构、特殊卷曲螺旋、模体以及富含脯氨酸(P)、谷氨酸(E)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的 PEST 序列等进行预测和分析, 并对三级结构进行同源建模, 对其表面电位、可及性分布以及 Ramachandran 图等进行分析。枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 是一种由 212 个氨基酸组成的稳定的脂溶性蛋白质, 其亲、疏水性最强的区域分别为 Lys75~Asn81 和 Val9~Leu17; 不存在稳定的二聚体、三聚体卷曲螺旋和非 PEST 序列; 有 3 种可能参与不同的生化反应的模体; 有 5 段 α -螺旋、6 段 β -折叠的 α/β 类蛋白; 整体呈弱正电势; LipA 的可及性和 Ramachandran 图表明建模得到的三维结构是合理、可靠的。该研究为后续对枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 的分子设计和改造提供了一定的理论基础。

关键词: 枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA; 生物信息学; 同源建模

文章编号: 1673-9078(2022)07-113-119

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.7.1130

The Bioinformatics Analysis of the Lipase LipA from *Bacillus subtilis*

LI Jingjing^{1,2}, LAI Xinjue², LI Xinyao², MA Junwei², YU Minyi², LUO Jiawei², CHEN Yinxi², YU Jieting²,
ZHENG Shaopeng², ZHENG Dunjin^{1,2}, CAO Shilin^{1,2*}, CHEN Wanjuan³

(1. Guangdong Key Laboratory of Food Intelligent Manufacturing, Foshan University, Foshan 528000, China)

(2. School of Food Science and Technology, Foshan University, Foshan 528000, China)

(3. School of Materials Science and Hydrogen Energy, Foshan University, Foshan 528000, China)

Abstract: In this study, bioinformatics methods were applied to analyze the *Bacillus subtilis* lipase LipA, aiming to lay some theoretical foundation for the subsequent study of LipA. The primary structure, hydrophobicity, basic properties, secondary structure, special crimp helix, motif and PEST sequences rich in proline (p), glutamic acid (E), serine (s) and threonine (T) of LipA were predicted and analyzed by using a series of online websites or software, the homology modeling of the tertiary structure was carried out, and the surface potential, the accessibility distribution and the Ramachandran diagram were analyzed. *Bacillus subtilis* lipase LipA is a stable liposoluble protein composed of 212 amino acids. The regions with the strongest hydrophilicity and hydrophobicity were predicted to be Lys75~Asn81 and Val9~Leu17, and there is no stable dimer, trimer curling helix and non-PEST sequences. LipA was found to have three motifs that may participate in different biochemical reactions, as well as α/β proteins with five segments α -helix, six-segment β -sheets; LipA is predicted to be weak positive potential; The modeled three-dimensional structure is shown by accessibility and Ramachandran diagram to be reasonable and reliable. The subsequent molecular design and modification of *Bacillus subtilis* lipase LipA were provided with some theoretical basis in this study.

引文格式:

黎菁菁, 赖昕珏, 李鑫尧, 等. 枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 的生物信息学分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(7): 113-119, +10

LI Jingjing, LAI Xinjue, LI Xinyao, et al. The bioinformatics analysis of the lipase LipA from *Bacillus subtilis* [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(7): 113-119, +10

收稿日期: 2021-10-12

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金佛山市联合基金(粤佛联合基金)青年基金项目(2019A1515110621; 2019A1515111049); 广东普通高校青年创新人才项目(自然科学类)(2017KQNCX217); 佛山科学技术学院高层次人才启动项目(GG07016); 广东省科技创新战略专项资金项目(pdjh2020b0627; pdjh2022b0550); 佛山科学技术学院实验室开放创新基金(2022 No. 005)

作者简介: 黎菁菁(1997-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1907095137@qq.com

通讯作者: 曹诗林(1987-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物合成与生物转化, E-mail: shilin.cao@qq.com

Key words: *Bacillus subtilis* lipase LipA; bioinformatics; homologous modeling

脂肪酶,是一类能特异地在油水界面上水解三脂酰甘油酯键的酶^[1],广泛存在于微生物、人体、动物以及植物中。目前最常见的脂肪酶生产方式为微生物发酵法,其次还有提取法。由于微生物具有繁殖速度快、种类多的特性,其产生的脂肪酶种类多,具有较强的稳定性、底物特异性,水解作用的温度和 pH 范围更广^[2],并且大多数的脂肪酶为胞外酶^[3],使得更方便快捷地在工业生产中得到纯度较高的酶制剂,因此微生物发酵产脂肪酶已成为工业生产脂肪酶的主要途径,有关微生物脂肪酶生产的相关研究也越来越多。

枯草芽孢杆菌是革兰氏阳性菌,由于其具有非致病性、分泌能力较强以及发酵工艺成熟等优势,已成为进行基因研究及其表达的一种重要的工具系统,在基因工程中也有深入的研究^[4,5]。枯草芽孢杆菌能够产生的使脂类水解的酶主要有三种,分别是脂肪酶(LipA)、磷脂酶以及酯酶(LipB),其中脂肪酶(LipA)是由 lipA 基因编码的胞外水解酶,能够较好地水解中等长度链长脂肪酸形成的酯键,在食品、医药、化妆品等多个领域具有广泛的应用前景^[6,7]。枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 结构基因全长为 636 bp,能够编码 212 个氨基酸,并组装成分子量为 22644 u 的脂肪酶前体,枯草芽孢杆菌所产生的脂肪酶(LipA)中缺乏半胱氨酸残基,难以形成二硫键稳定结构,并缺乏多数脂肪酶普遍存在的盖子结构^[8]。此外,LipA 序列中含有 A-X-S-X-G 保守序列。目前,对 LipA 的研究主要集中于分泌途径、催化机理、酶学性质、固定化提高酶活力以及通过基因工程改变其立体选择性、热稳定性与提高酶产量^[9,10]。本研究应用生物信息学方法对枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 的基本结构、基本特性、模体、表面电位、可及性等进行系统分析,为后续 LipA 的分子设计和改造工作提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 数据来源

LipA 的氨基酸序列来源于美国国家生物信息中心 NCBI, GenBank 登录号: ACA60974.1。

1.2 LipA 性质预测

LipA 的亲/疏水性分析:使用 ProtScale 在线程序^[11]对亲/疏水性预测,并对疏水性最强的区域及其亲水性最强的区域进行分析。

LipA 的基本特性预测分析:使用 ProtParam 在线

程序^[12]对 LipA 的不稳定指数、消光系数、脂溶指数、平均亲水性进行预测。

LipA 表面电位预测:使用软件 Swiss-Pdb-viewer 4.1.0^[13]对 LipA 蛋白质表面静电构象进行建模。

LipA 的可及性分析:使用软件 Swiss-Pdb-viewer 4.1.0 对 LipA 蛋白质的可及性模型进行建模。

1.3 LipA 结构预测

LipA 一级结构分析:使用 ProtParam 在线程序对碱性氨基酸、酸性氨基酸个数、相对质量及其等电点、氨基酸含量进行预测。

LipA 二级结构的预测:使用 NPSA 在线网站所提供的二级结构预测程序^[14],用 SOPM 的预测方法分析二级结构中的 α 螺旋、 β 转角和无规则卷曲等结构。

LipA 的特殊卷曲螺旋预测:使用 COILS 在线程序^[15]对 LipA 的卷曲螺旋区域进行分析,通过在线网址 Multicoil Scoring Form^[16]对 LipA 的二聚体、三聚体卷曲螺旋进行预测。

LipA 的模体预测:使用 MotifScan 在线网站^[17]对脂肪酶 LipA 蛋白序列进行模体预测。

LipA 的 PEST 序列预测:使用 epestfind 程序^[18]预测 LipA 的 PEST 序列。

LipA 的三级结构分析:通过在线工具 trRosetta 在线程序^[19,20]对脂肪酶 LipA 进行建模,选取最合理的模型,用 Pymol 软件对 LipA 进行可视化分析,使用 PSIPRED 在线程序^[21]分析 α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲 3 种结构的数目。

LipA 的 Ramachandran 图分析:使用软件 Swiss-Pdbviewer 4.1.0 获得 Ramachandran Plot (拉氏构象图),并使用 PROCHECK 在线网址^[22]分析得到其区域数据。

1.4 数据处理

使用 Excel 2019 对模体预测数据进行归纳处理,使用 PowerPoint 2019 对二级结构、三级结构、表面电位、可及性和 Ramachandran 图分析的图片进行处理。

2 结果与讨论

2.1 LipA 一级结构分析

使用在线程序 ProtParam 进行预测,得出其相对分子质量为 22664.02,预测其等电点 pI=9.57。20 种氨基酸中的含量排序依次是甘氨酸 Gly (11.3%)、缬

氨酸 Val (9.9%)、亮氨酸 Leu (9.9%)、天冬酰胺 Asn (8%)、丝氨酸 Ser (8%)、丙氨酸 Ala (7.5%)、赖氨酸 Lys (6.6%)、异亮氨酸 Ile (5.7%)、苏氨酸 Thr (5.7%)、天冬氨酸 Asp (4.2%)、酪氨酸 Tyr (4.2%)、谷氨酰胺 Gln (3.3%)、精氨酸 Arg (2.8%)、甲硫氨酸 Met (2.8%)、组氨酸 His (2.4%)、脯氨酸 Pro (2.4%)、苯丙氨酸 Phe (2.4%)、谷氨酸 Glu (1.4%)、色氨酸 Trp (0.9%)、半胱氨酸 Cys (0.5%)。

LipA 的本质是由氨基酸为基本单位构成的蛋白质, 蛋白质的酸碱性和其重要的理化性质之一。蛋白质的一级结构是研究蛋白质的结构、生理功能和作用机制的基础。蛋白质的一级结构是根据遗传密码编码的氨基酸通过肽键结合形成的多肽链, 蛋白质侧链上含有的酸性氨基酸和碱性氨基酸上带有可解离的基团, 这些可解离基团可以决定蛋白质的酸碱性和, 因此蛋白质的酸碱性和可依赖于蛋白质一级结构中酸性氨基酸和碱性氨基酸的数量之比^[23]。蛋白质的等电点与氨基酸的组成、属性和分子量的分布有关。蛋白质侧链可电离氨基酸的 pKR 值可影响蛋白质的等电点, 即酸性氨基酸和碱性氨基酸侧链上的氨基和羧基的电离常数与蛋白质的等电点有关^[24]。根据 ProtParam 的预测结果显示, 脂肪酶 LipA 呈碱性, 由 212 个氨基酸构成, 其中包含 25 个碱性氨基酸和 12 个酸性氨基酸, 等电点 pI=9.57, 而微生物脂肪酶的等电点多为酸性, 如疏棉状嗜热丝孢菌的脂肪酶等电点为 4.4、白地霉脂肪酶的等电点为 5.39^[25,26]。

2.2 LipA 的亲/疏水性分析

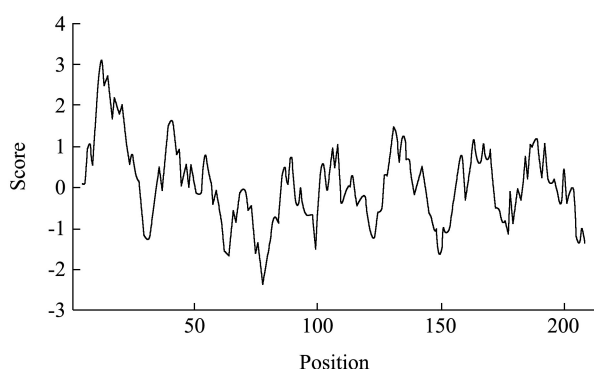


图 1 LipA 疏水性分析和亲水性分析

Fig.1 LipA hydrophobicity analysis and LipA hydrophilic analysis

用在线程序 ProtScale 对脂肪酶 LipA 进行亲/疏水性预测, 确定最大亲水值和最大疏水值及其相对应的位置。根据负值越大表示蛋白亲水性越强、正值越大表示蛋白疏水性越强, 可知第 12 位的缬氨酸正值最大为 3.111, 在 12 个区域具有疏水性, LipA 疏水性最强

的区域在 Val9~Leu17 区间; 第 78 位的苏氨酸负值最大为-2.333, LipA 亲水性最强的区域在 Lys75~Asn81 区间, 如图 1 所示。

氨基酸的亲、疏水性分布对蛋白质的结构和生理功能有着重要意义。亲水性和疏水性氨基酸可以预测跨膜蛋白的位置, 构成疏水的二级结构, 便于蛋白质跨膜、形成更高级结构, 同时疏水氨基酸的疏水基团还可以促使蛋白质二级结构的折叠^[27]。根据预测结果可知疏水性最强区域与其他天然脂肪酶一样在 N 端, 这可能与蛋白质的定位与分泌有关。

2.3 LipA 的基本特性预测分析

使用在线程序 ProtParam 对 LipA 的基本特性预测分析。结果表明 LipA 的不稳定指数为 19.12, 可知其属于稳定蛋白质; 在 280 nm 波长下消光系数为 $24410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; 脂溶指数为 96.98; 平均亲水性是 0.009。

蛋白质的稳定性受到许多因素的影响, 若要预测蛋白质的稳定性可以用蛋白质的不稳定指数, 蛋白质的不稳定指数低于 40 时, 则为稳定性蛋白质, 相反, 不稳定指数高于 40 则为不稳定性蛋白质^[28]。通过在线程序 ProtParam 预测得到 LipA 的不稳定指数为 19.12, 因此 LipA 属于稳定蛋白质, 具有一定的稳定性。蛋白质的消光系数是指蛋白质对某波长的光的吸收能力的量度, 与半胱氨酸的组成比例有一定的关系^[29], 由于 LipA 仅有一个半胱氨酸残基, 蛋白中不存在二硫键, 因此 LipA 在 280 nm 波长下消光系数只有 $24410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。脂溶指数为 96.98 (<100), 并且平均亲水性是 0.009, 可知 LipA 是属于脂溶性蛋白质^[30]。

2.4 LipA 二级结构的预测

蛋白质的二级结构主要是指蛋白质的多肽链主链上规则卷曲或折叠的构象, 利用 NPSA 在线软件对脂肪酶 LipA 的二级结构进行预测, 统计其中 α -螺旋、 β -转角、延伸链和无规则卷曲分别对应的百分比, 结果表明, 二级结构中组分含量从大到小排序均为 α -螺旋 (29.72%)>无规则卷曲 (29.25%)> β -延伸链 (26.42%)> β -转角 (14.62%)。(图 2)

LipA 的二级结构预测得知 LipA 含有 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链和 β -转角等四种结构, 其中 α -螺旋和无规则卷曲的占比较大, 分别为 29.72%和 29.25%, 推测其空间结构较小, 且受到侧链间相互作用较大的影响, 而 β -延伸链能够进一步形成 β -折叠结构且占比达 26.42%, 其二级结构比例符合 $\alpha\beta$ 类蛋白的特征, 与绝大多数的微生物脂肪酶相似^[31,32]。同时, LipA 的催化三联体结构 Ser77、Asp133 和 His156 与其他的第

的三级结构预测结果显示 LipA 三级结构中包含 5 段 α -螺旋、6 段 β -折叠和丰富的无规则卷曲, 而自然界中的脂肪酶一般为 α/β 类蛋白^[39], 因此 LipA 的预测结果与二级结构的预测结果基本一致, 与同类脂肪酶的结构一致。

2.9 LipA 表面电位预测

使用软件 Swiss-Pdb-viewer 4.1.0 对 LipA 蛋白质表面静电构象进行建模的结果(见图 3b)。图中分布着蓝色和红色两种结构, 前者代表正电势, 后者代表负电势。由图可知, 蓝色的正电势集团分散分布, 占据了大部分的位置, 红色的负电势集团相对集中, 占据较少的位置但集团较大, 使得 LipA 整体呈弱正电势。

蛋白质的电荷密度目前大多通过分子帽分割法进行研究^[40], 而蛋白质的电势分布能够影响蛋白质在带电表面的吸附行为^[41], 通过 LipA 的表面电位预测构象可知 LipA 的正电势集团的分布相对分散, 而负电势集团分布相对集中, LipA 整体上呈弱正电势, 这结果对于后续研究 LipA 的分子表面吸附和电位差异有一定的意义。

2.10 LipA 的可及性分析

LipA 可及性模型的建模结果(图 3c), 一般情况下, 处于分子表面的氨基酸残基(尤其是带正电荷的赖氨酸和精氨酸)的可及性较大, 深埋于分子内部的残基可及性很小。判断氨基酸残基与溶剂的接触程度的强弱可以通过观察其颜色的强弱程度(黄色>绿色>蓝色)。

蛋白质的可及性反映了蛋白质表面的氨基酸残基

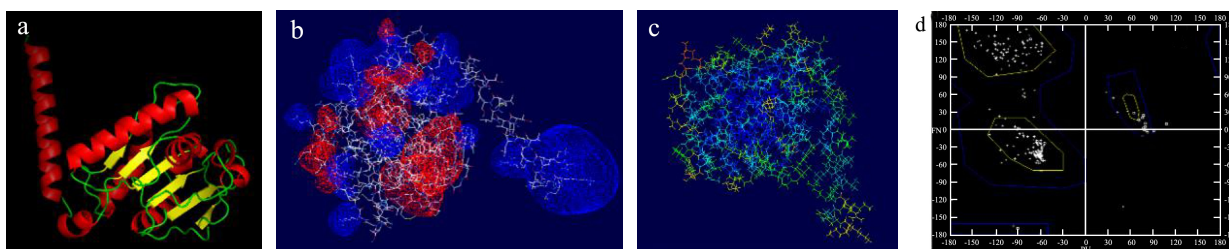


图 3 LipA 的三级结构和性质预测

Fig.3 The tertiary structure and properties prediction of LipA

注: a: LipA 三级结构预测; b: LipA 表面电位预测; c: LipA 可及性分析; d: LipA 的 Ramachandran 图。

3 结论

使用生物信息学方法分析 LipA 的结构特性与蛋白质特性, 得出枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 由 212 个氨基酸组成, 等电点为 9.57, 呈碱性; 亲、疏水性最强的区域分别为 Lys75~Asn81 和 Val9~Leu17, 该区域发生突变时可能会影响蛋白质的折叠, 进而影响其结

与水或其他溶剂接触的可能性^[42], 通过建模发现 LipA 的表面氨基酸残基与水分子接触的可达性大, 而 LipA 内部的氨基酸残基可达性小, 这说明可达性的大小与蛋白质的结构有密切关系, 对于研究蛋白质的结构有重要意义。

2.11 LipA 的 Ramachandran 图分析

为了判断 LipA 的构象合理性, 本研究利用软件 Swiss-Pdbviewer 4.1.0 进行拉氏分析得到 Ramachandran Plot (拉氏构象图) 见(图 3d)。如坐标图中蓝线内区域内为一般允许区, 蓝线外的区域为不允许区。一般而言, 蛋白质结构模型中如果有超过 90% 的二面角位于一般允许区, 则其空间结构具有稳定性。LipA 的结果(图 3d)表明: 拉氏图中最合理区(黄线内)和一般允许区(蓝线内)以及不允许区(蓝线外)的残基数占比分别为 91.7%、7.2%和 1.1%, 在允许区内总计占 98.9% (大于 90%), 由此可知, 利用 trRosetta 进行建模得到的 LipA 的模型是合理和可靠的。

Ramachandran 图可以用于描述蛋白质的主链碳的 ψ 角与 ϕ 角所产生的低能构象, 如果没有任何非键合原子间距离小于短接触准则的限制距离, 则 (ϕ, ψ) 值被认为是允许的或无空间冲突的, Ramachandran 图还定义了蛋白质骨架的可访问构象空间的限制^[43], 因此 Ramachandran 图可用于判断蛋白质构象的合理性。对 LipA 的 Ramachandran 图进行分析, 得到 LipA 的 ψ 角与 ϕ 角的 98.9% 位于 Ramachandran 的允许区, 这说明通过建模得到的 LipA 的三维构象具有科学性、合理性和可靠性。

构与生理功能; 其不稳定指数、脂溶指数和平均亲水性表明 LipA 属于稳定的脂溶性蛋白质; 但不存在稳定的二聚体、三聚体卷曲螺旋; 有 3 个不同的模体, 可能参与了不同的生化反应; 不存在非 PEST 序列, 可能具有较强的降解蛋白的能力; 有 5 段 α -螺旋、6 段 β -折叠, 属于典型的 α/β 类蛋白; 整体呈弱正电势; LipA 的可及性和 Ramachandran 图表明建模得到的三

维结构是合理、可靠的。LipA 与其他微生物脂肪酶的不同之处主要在于其缺乏盖子结构,活性中心暴露,除此之外,LipA 的二、三级结构和催化活性基团均与其他微生物脂肪酶相似。本研究系统地分析了 LipA 的结构与蛋白质特性,为后续 LipA 在提高表达量和热稳定性等方面的改造研究提供一定的科学依据和理论基础。

参考文献

- [1] Gowland P, Kernick M, Sundaram T K. Thermophilic bacterial isolates producing lipase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 3: 339-343
- [2] 汪玲.微生物脂肪酶的性质及应用[J].生物化工,2020,6(3): 161-163
WANG Ling. The properties and applications of microbial lipase [J]. Biochemical Engineering, 2020, 6(3): 161-163
- [3] 胡兴翠,刘建华.微生物脂肪酶特性及工业应用[J].基因组学与应用生物学,2019,38(8):3572-3579
HU Xingcui, LIU Jianhua. Characteristics and industrial application of microbial lipase [J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(8): 3572-3579
- [4] 彭清忠,张惟材,朱厚础.枯草杆菌表达系统的研究进展[J].生物技术通讯,2001,3:220-225
PENG Qingzhong, ZHANG Weicai, ZHU Houchu. Research progress of *Bacillus subtilis* expression system [J]. Biotechnology Communications, 2001, 3: 220-225
- [5] 孔祥菊.脂肪酶工程菌的构建、表达、纯化及酶学性质的研究[D].长春:吉林大学,2001
KONG Xiangju. Construction, expression, purification and enzymatic properties of lipase engineering bacteria [D]. Changchun: Jilin University, 2001.
- [6] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 390-397
- [7] Eggert T, Pencreac' H G, Douchet I, et al. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(21): 6459-6469
- [8] Eggert T, Pouderoyn G V, Dijkstra B W, et al. Lipolytic enzymes lipA and lipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure [J]. FEBS Letters, 2001, 502(3): 89-92
- [9] 吴凤依.组合策略提高脂肪酶 A 在枯草芽孢杆菌中的分泌表达[D].广州:华南理工大学,2020
WU Fengyi. Combination strategy to increase the secretory expression of lipaseA in *Bacillus subtilis* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020
- [10] 赵博.定向进化及定点突变提高枯草芽孢杆菌脂肪酶的活力和立体选择性[D].长春:吉林大学,2009
ZHAO Bo. Directed evolution and site-directed mutation improve the activity and stereoselectivity of *Bacillus subtilis* lipase [D]. Changchun: Jilin University, 2009
- [11] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 157(1): 105-132
- [12] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, et al. Protein identification and analysis tools on the ExpASy server [J]. The Proteomics Protocols Handbook, 2005: 571-607
- [13] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the SWISS-PDB viewer: an environment for comparative protein modeling [J]. Electrophoresis, 1997, 18(15): 2714-2723
- [14] Geourjon C, Deleage G. SOPM: a self-optimized method for protein secondary structure prediction [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1994, 7(2): 157-164
- [15] Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences [J]. Science, 1991, 252: 1162-1164
- [16] Wolf E, Kim P S, Berger B. MultiCoil: a program for predicting two- and three- stranded coiled coils [J]. Protein Science, 1997, 6(6): 1179-1189
- [17] Sigrist C J A, Cerutti L, De Castro E, et al. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation [J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38: 161-166
- [18] Rechsteiner M, Rogers S W. PEST sequences and regulation by proteolysis [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(7): 267-271
- [19] Du Z, Su H, Wang W, et al. The trRosetta server for fast and accurate protein structure prediction [J]. Nature Protocols, 2021, 16(12): 5634-5651
- [20] Yang J, Anishchenko I, Park H, et al. Improved protein structure prediction using predicted inter residue orientations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020, 117(3): 1496-1503
- [21] Jones D T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 292(2): 195-202
- [22] Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S, et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures [J]. Journal of Applied Crystallography, 1993, 26(2): 283-291
- [23] 吴斌.固定化细胞酶性质及蛋白质分子可及性研究[D].武

- 汉:武汉大学,2003
- WU Bin. Study on the properties of immobilized cell enzymes and the accessibility of protein molecules [D]. Wuhan: Wuhan University, 2003
- [24] 吴松锋.蛋白质组表达谱基本生物信息学研究及全蛋白质组等电点分布研究[D].北京:解放军军事医学科学院,2005
- WU Songfeng. Basic bioinformatics study of proteome expression profile and study of isoelectric point distribution of whole proteome [D]. Beijing: Chinese Academy of Military Medical Sciences, 2005
- [25] 唐敏源.疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶催化活性的分子改造[D].昆明:云南师范大学,2020
- TANG Minyuan. Molecular modification of lipase catalytic activity of *Thermomyces lanuginosa* [D]. Kunming: Yunnan Normal University, 2020
- [26] 乔汉桢.脂肪酶产生菌的筛选、基因克隆、密码子优化及其高效表达[D].广州:华南农业大学,2017
- QIAO Hanzhen. Screening, gene cloning, codon optimization and high expression of lipase-producing bacteria [D]. Guangzhou: South China Agricultural University,2017
- [27] 李吉.膜蛋白跨膜螺旋预测的研究[D].上海:上海交通大学,2010
- LI Ji. Research on the prediction of membrane protein transmembrane helix [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2010
- [28] Gamage D G, Gunaratne A, Periyannan G R, et al. Applicability of instability index for in vitro protein stability prediction [J]. Protein and Peptide Letters, 2019, 26(5): 339-347
- [29] Pace C N, Vajdos F, Fee L, et al. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein [J]. Protein Science, 1995, 4(11): 2411-2423
- [30] 刘娜,吴金华,安亚茹,等.陆地棉抗坏血酸过氧化物酶基因家族全基因组生物信息学分析[J].棉花学报,2017,29(1):17-28
- LIU Na, WU Jinhua, AN Yaru, et al. Genome-wide bioinformatics analysis of ascorbate peroxidase gene family in upland cotton [J]. Cotton Journal, 2017, 29(1): 17-28
- [31] 舒正玉.黑曲霉脂肪酶的酶学性质、基因克隆与表达及结构预测[D].武汉:华中科技大学,2007
- SHU Zhengyu. Enzymatic properties, gene cloning and expression and structure prediction of *Aspergillus niger* lipase [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007
- [32] Ferrer M, Bargiela R, Martínez-Martínez M, et al. Biodiversity for biocatalysis: a review of the α/β -hydrolase fold superfamily of esterases-lipases discovered in metagenomes [J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2015, 33(5-6): 235-249
- [33] Nardini M, Lang D A, Liebeton K, et al. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation: the prototype for family I. 1 of bacterial lipases [J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(40): 31219-31225
- [34] Danielsen S, Eklund M, Deussen H J, et al. *In vitro* selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor [J]. Gene, 2001, 272(1-2): 267-274
- [35] 汪瑶.米根霉脂肪酶的稳定性及稳定剂研究[D].武汉:华中科技大学,2019
- WANG Yao. Study on the stability and stabilizer of *Rhizopus oryzae* lipase [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2019
- [36] Decatur A L, Portnoy D A. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity [J]. Science, 2000, 290(5493): 992-995
- [37] 袁龙,郑幽,范杰,等.低稳定性绿色荧光蛋白 EGFP-PEST 的载体构建及表达验证[J].生物技术通讯,2017,28(4):405-409
- YUAN Long, ZHENG You, FAN Jie et al. Vector construction and expression verification of low stability green fluorescent protein EGFP-PEST [J]. Biotechnology Communications, 2017, 28(4): 405-409
- [38] 丁静,钱俊青.蛋白质二级与三级结构的表征方法[J].浙江化工,2020,51(11):49-54
- DING Jing, QIAN Junqing. Characterization method of protein secondary and tertiary structure [J]. Zhejiang Chemical Industry, 2020, 51(11): 49-54
- [39] 李灵利.脂肪酶的分子动力学模拟[D].北京:北京化工大学,2013
- LI Lingli. Molecular dynamics simulation of lipase [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2013
- [40] Zhang S. Ab initio calculation of electron density for p53 tumor suppressor protein [J]. Journal of Shandong Normal University (Natural Science), 2006, 1: 57-58, 61
- [41] Boubeta F M, Soler-Illia G, Tagliacozzi M. Electrostatically driven protein adsorption: charge patches versus charge regulation [J]. Langmuir, 2018, 34(51): 15727-15738

(下转第 10 页)