

脂肪酶底物结合口袋的分子改造策略及进展

蔡玉贞 白巧燕 苏敏 唐良华

(福建师范大学生命科学学院, 福州 350108)

摘要: 脂肪酶作为重要的酶制剂之一, 因其对映选择性、立体选择性和广泛的底物特异性等特性被广泛地运用在工业生产中。为了提高脂肪酶的酶学特性和理化性质、迎合更高的工业需求, 除了从酶反应的条件上进行优化, 还可对脂肪酶进行分子改造, 从根源上提高酶的催化效率。一般常采用半理性设计或理性设计的策略, 在底物结合口袋或“盖子”结构附近进行酶分子的改造, 以达到改变脂肪酶的底物特异性、立体选择性、对映选择性和区域选择性等目的。对近几十年来关于脂肪酶底物结合口袋的分子改造研究进行了综述, 以期今后的相关工作提供研究思路。

关键词: 脂肪酶; 底物结合口袋; 半理性设计; 理性设计

DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2020-0123

Strategies and Advances in the Molecular Modification of Substrate Binding Pocket of Lipase

CAI Yu-zhen BAI Qiao-yan SU Min TANG Liang-hua

(College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108)

Abstract: Lipase is one of the important enzymes and widely used in industrial processes due to its high enantioselectivity, stereoselectivity and broad substrate specificity. In addition to optimize the reaction conditions of lipases, people can also molecularly modify the lipase and essentially improve the catalytic efficiency in order to improve the enzymatic and physicochemical properties of lipase as well as to meet the high industrial demand. Generally, semi-rational design and rational design are often applied in molecular modification of binding pocket or “lid” domain of lipases for changing their substrate specificities, stereoselectivities, enantioselectivities, regioselectivities, etc. In this article, the molecular modification of lipase substrate binding pocket in recent decades is reviewed, aiming at providing some clues for relevant researches in the future.

Key words: lipase; substrate binding pocket; semi-rational design; rational design

脂肪酶是一种可以在水/油界面上将长链三酰基甘油酯水解为二酰基甘油酯、单酰基甘油酯、甘油和游离脂肪酸的酶。大部分的脂肪酶都具有 $\alpha\beta$ 水解酶折叠的结构特征, 活性位点是由 Ser-His-Asp / Glu 组成的催化三联体, 但与大多数丝氨酸蛋白酶不同, 该活性位点被包埋在酶分子的结构内部。

脂肪酶的活性位点附近结构大多呈口袋的形状, 因此根据脂肪酶底物结合口袋的形状, 可将脂肪酶

分为3个种类:(1)具有疏水性的裂缝状结合口袋的脂肪酶;(2)具有隧道状的结合口袋的脂肪酶;(3)具有漏斗状的结合口袋的脂肪酶^[1](图1)。大部分的脂肪酶都含有“盖子”结构, 该结构一般是由一至两个两亲性的 α 螺旋或者是一段loop构成^[2]。在水相中, 脂肪酶的“盖子”呈“闭合”状态, 活性中心被“盖子”遮挡, 脂肪酶表现出极低的催化活性甚至没有催化活性。而在水/油界面中, 脂肪酶

收稿日期: 2020-02-11

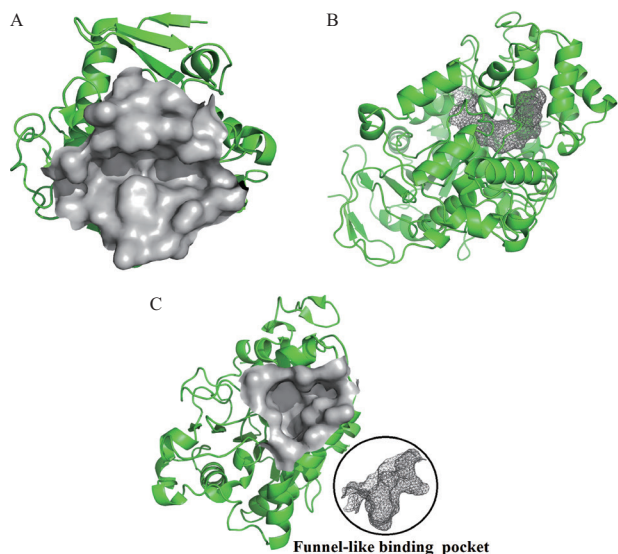
基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81072616), 福建省自然科学基金面上项目(2017J01442)

作者简介: 蔡玉贞, 女, 硕士, 研究方向: 酶工程; E-mail: 2968128035@qq.com

通讯作者: 唐良华, 男, 博士, 教授, 研究方向: 酶工程; E-mail: biotlh@fjnu.edu.cn

的“盖子”呈“开放”构象，酶被“激活”，原本被“盖子”覆盖的活性中心被暴露出来，底物因此能够进入酶的底物结合口袋，与催化位点结合，相应的催化反应得以进行。

脂肪酶具催化高效性和广泛的底物特异性，且进行催化反应的条件温和、安全，这使其在工业应用中备受青睐，不管是在医疗领域还是在食品、化工领域，人们对脂肪酶催化能力的期待越来越高。由于酶的活性中心对脂肪酶的催化活性起着至关重要的作用，因此催化活性中心附近，即催化位点或底物结合口袋成为了脂肪酶改造的热点区域。



A : *Rhizomucor miehei* lipase (RML) 裂缝状结合口袋；B : *Candida rugosa* lipase (CRL) 隧道状结合口袋；C : *Candida antarctica* lipase B (CALB) 漏斗状结合口袋

图1 三类脂肪酶底物结合口袋的三维立体结构

1 脂肪酶底物结合口袋的改造策略

目前对脂肪酶的改造都是利用蛋白质工程。蛋白质工程的方向主要有定向进化，半理性设计以及理性设计。定向进化存在突变体筛选效率低和筛选工作量过于庞大等缺陷；而半理性设计和理性设计，则是在序列信息、结构信息和催化机制等已有的蛋白质信息的基础上，通过定点突变或是缩减密码子表、迭代饱和突变等方案大幅缩小突变体文库、提高优良突变体获得的机率。因而，目前在酶的底物选择性、催化活性和热稳定性改造等方

面，半理性设计和理性设计是相对主流的改造策略（表1）。

改造酶的催化活性和稳定性的着眼点主要在于改变酶分子内部的氢键、范德华力、疏水作用、离子键、二硫键和 π 环体系的非经典相互作用等。在底物结合口袋范围内，影响脂肪酶催化活性的主要因素是关键氨基酸的体积大小，亲/疏水性大小，氨基酸残基之间的各种相互作用，而本文讲述的大多数改造底物结合口袋的半理性设计和理性设计均是以氨基酸的侧链大小、亲/疏水性以及 π 环体系相互作用等为出发点进行的。

1.1 理性设计

1.1.1 改变底物结合口袋中氨基酸残基侧链的大小 由于组成脂肪酶底物结合口袋的氨基酸的侧链大小可以影响底物进入口袋的空间位阻，进而影响酶与底物的结合，因此它们对脂肪酶的底物选择性、底物的进入和底物的释放均有着紧密的联系。一般可利用小侧链氨基酸替代底物结合口袋内的氨基酸以降低酶活性位点处的空间位阻，进而增加酶与底物的结合或相互作用，从而影响酶的酶学性质，如底物链长的偏好、立体选择性和位置选择性^[3]。这一理性设计策略，事实上已被广泛应用^[4]。

Brundiek等^[5]对南极假丝酵母脂肪酶A(*Candida antarctica* lipase A, CALA)短链脂肪酸选择性相关区域，即其酰基结合口袋进行改造。选择CALA初级酰基结合口袋处的G237进行理性设计，以期达到提高CALA对中长链脂肪酸(C6-C12)的特异性的目的。与野生型CALA相比，突变体G237V和G237Y对pNP-丁酸和pNP-己酸的水解活性显著提高，其中G237Y对pNP-己酸的水解活性是野生型的3倍。突变体G237V和G237Y都增加了底物结合主隧道的空间位阻，导致了中长链脂肪酸底物被分流到另一个可替代的结合口袋中，从而增加了酶对中长链脂肪酸的特异性。

Zhao等^[6]对从链霉菌W007菌株中分离的脂肪酶MAS1进行了结构分析后发现，在MAS1的底物结合口袋中存在8个具有较大侧链的氨基酸(F39、D137、H108、F153、Q201、V202、V203和V233)，并且可能会影响脂肪酶MAS1的催化功能。

表 1 脂肪酶底物结合口袋改造策略及成果

改造策略		脂肪酶	酶性质的改变	突变位点	突变结果	参考文献
理性设计	改变氨基酸侧链大小	<i>Malassezia globosa</i> lipase (MgMDL2)	位置选择性	F278 E282	F278A 和 E282A 获得水解三酰甘油的能 力	[3]
		<i>Candida Antarctica</i> lipase A (CALA)	底物链长偏好	G237	G237V 和 G237Y 对 pNP-C4 : 0 和 pNP-C6 : 0 水解活性显著提高, 其中 G237Y 对 pNP-C6 : 0 的水解活性高 WT 的 3 倍	[5]
		Lipase from <i>Streptomyces</i> sp. strain W007 (MAS1)	底物链长偏好	H108 F153 V233	H108A、F153A 和 V233A 对 pNP-C8 的 k_{cat}/K_m 分别是 WT 的 2.3、2.1、1.4 倍; 对 pNP-C16 的比活分别比 WT 提高了 3.0、2.2、2.0 倍	[6]
		<i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB)	立体选择性	W104	对 heptan-4-ol 和 nonan-5-ol 的 k_{cat}/K_m 分 别提高了 270 倍和 5 500 倍	[8]
	改变底物结合口袋的亲、疏水性	<i>Rhizopus chinensis</i> lipase (RCL)	底物链长、不饱 和脂肪酸偏好	H284 L285	突变体 HQL (H284 和 L285 之间插入 Q) 和 L285Q 对 <i>p</i> -NPP (C16) 的催化活 性分别为 WT 的 2.72 倍和 1.5 倍; HQL 水解不饱脂肪酸的活性是饱和脂肪酸 1.45 倍, 而 WT 只有 1.10 倍	[7]
		<i>Geobacillus zalihiae</i> lipase (T1 lipase)	对映选择性	Q114	Q114M 催化 (<i>R</i> , <i>S</i>) - 布洛芬与油酸醇 的选择性酯化反应中 <i>E</i> 值为 WT 的 3.2 倍	[9]
		<i>Geobacillus zalihiae</i> lipase (T1 lipase)	催化活性	Q114	Q114L 催化的丁酸薄荷酯的酯化反应的 转化率能够达到 92 %	[10]
	增加 π 环体系的非经典相互作用	<i>Rhizomucor miehei</i> lipase (RML)	催化活性	P209 L258	对硝基苯酯 (C6) 的比活提高了 3.98 倍	[14]
	半理性设计	<i>Candida rugosa</i> lipase (LIP2)	底物链长偏好	L132	L132A 和 L132I 的底物特异性表现出向 中长链的脂肪酸转移	[15]
		<i>Candida Antarctica</i> lipase A (CALA)	对映选择性	F233	以 2- 苯基丙酸对硝基苯基酯为底物的 催化反应中, F233G 的 <i>E</i> 值高达 259	[16]
	迭代饱和和突变 (ISM)	<i>Bacillus subtilis</i> lipase (Lip A)	热稳定性	R33/D34/K35 K112/ M134 Y139/I157	以 4- 硝基苯基辛酸酯底物测得两个最 佳突变体 (M134D/I157M/Y139C/K112D/ R33Q/D34N/K35D) 和 (M134D/I157M/ Y139C/K112D /R33G) 的 T_{50}^{60} 分别 为 89℃ 和 93℃, 远高于 WT (T_{50}^{60} 为 48℃)	[17]
	ISM/ 简并密码子 NDT	<i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB)	立体选择性	W104/L144 V149/V154 I189/V190 A281/A282	(V149D/I189V/V190C/A281G/A282V) 对 2- 苯基丙酸对硝基苯酯的 k_{cat} / K_m 为 WT 的近 277 倍, 突变体 (W104C/L144Y/ V149I/V154I/A281C/A282F) 对 <i>R</i> -2- 苯基 丙酸对硝基苯酯的活性比 WT 高 15 倍	[18]
	理性聚焦迭代定点诱变 (FRISM)	<i>Candida antarctica</i> lipase B (CALB)	对映选择性	W104/ D134 Q157/I189 V190/ A281 A282	突变体 (A281G/A282V/V190C)、 (Q157L/I189A)、 (W104/I189)、(W104A/I189M/V190C/ D134L) 对各自的最佳对映体的选择性分 别高达 95%、94%、95% 和 91%	[19]

因此, Zhao 等^[6]利用丙氨酸分别替换这 8 个氨基酸, 期望通过减小底物结合口袋的空间位阻以提高脂肪酶的催化活性。通过筛选得到较好的突变体 *H108A*、*F153A* 和 *V233A*, 以 pNP-C8 为底物测得它们的 k_{cat}/K_m 分别是野生型的 2.3、2.1、1.4 倍。这 3 个突变体链长偏好由中短链转变为了中长链。它们对 pNP-C16 的比活分别比野生型提高了 3.0、2.2、2.0 倍。一般来说增大脂肪酶底物结合口袋处的氨基酸空间位阻, 会降低其对长链脂肪酸的选择性, 但是也有例外^[7]。

南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) 具有一个立体专一性的口袋, 该口袋由 Thr42、Ser47 和 Trp104 构成。由于该立体专一性口袋空间的局限, 导致其只对取代基不大于乙基的仲醇具有较高的立体选择性。为提高 CALB 对具有大取代基的仲醇的选择性, Magnusson 等^[8]构建突变体 *Trp104Ala*, 以增大该结合口袋的空间。突变体 *Trp104Ala* 对 4-庚醇和 5-壬醇的底物特异性分别提高了 270 倍和 5 500 倍。

1.1.2 改变底物结合口袋的亲、疏水性 蛋白质的结构特征是其亲水/疏水性的作用的平衡结果: 蛋白质中大部分的非极性氨基酸侧链因避开水向蛋白质的内核聚集, 而在外层的大部分是亲水性氨基酸, 蛋白质的这种结构在水溶液中非常稳定。疏水作用有助于肽链的折叠, 因此蛋白质结构的稳定性在很大程度上受疏水作用的影响。由于脂肪酶的底物结合口袋呈疏水性, 因此维持甚至是提高脂肪酶底物结合口袋的疏水性能够增加其对底物酯的结合、选择性^[9]及口袋的稳定性, 从而导致脂肪酶的催化活性和热稳定性等方面的提高。

Wahab 等^[10]通过定点突变用疏水性的 Leu 和 Met 替代 *Geobacillus zalihae* 脂肪酶 (T1 脂肪酶) 氧阴离子洞处的 Q114, 以丁酸薄荷酯的酯化反应为模型, 评估了野生型和突变体的催化效率。最终发现酶的突变体 *Q114L* 的转化率可达 92%, 而野生型只有 84.6%。这是由于局部的疏水性的增加增强了疏水键、范德华力等相互作用, 使酶能更长时间地保持催化位点附近有活性的结构形状。

通过增加底物结合口袋的亲水性也能够提高脂肪酶对长链脂肪酸的选择性。江传欢等^[7]为了提高

华根霉 (*Rhizopus chinensis*) 脂肪酶对长链脂肪酸和不饱和脂肪酸的特异性, 分别将底物结合口袋中的 L285、T286 突变成谷氨酰胺, 并且另构建一突变体 HQL: 在 H284 和 L285 之间插入一个谷氨酰胺, 以增加该位置的亲水性。结果表明, 突变体 HQL 对长链脂肪酸的特异性增强了, 其对 *p*-NPP (C16) 的催化活性为野生型的 2.72 倍, 且其水解不饱和脂肪酸的活性是饱和脂肪酸 1.45 倍, 而野生型只有 1.10 倍。而 L285Q 在不同链长脂肪酸的底物中, 对 *p*-NPP (C16) 的催化活性最高, 是野生型的 1.5 倍。

1.1.3 增加 π 环体系的非经典相互作用 脂肪酶中芳香族氨基酸除了能够与周围的氨基酸形成疏水相互作用之外, 还能形成非经典的相互作用, 如 π - π 、C-H $\cdots\pi$ 、N-H $\cdots\pi$ 、O-H $\cdots\pi$ 和阳离子 $\cdots\pi$ 相互作用^[11]。芳香族氨基酸残基之间的相互作用在蛋白质的热稳定性和结构稳定性方面起着重要的作用^[12-13]。疏绵状嗜热丝孢菌脂肪酶 (*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL)、疏绵状嗜热丝孢菌 DSM 10635 脂肪酶 (*Thermomyces lanuginosus* DSM 10635 lipase, Lip)、米根霉脂肪酶 (*Rhizopus oryzae* lipase, ROL) 和米黑根毛霉脂肪酶 (*Rhizomucor miehei* lipase, RML), 具有高度的结构同源性。Ding 等^[14]构建了上述 4 个脂肪酶的双突变体: TLL (P207F/L259F), Lip (P207F/L259F), ROL (P210F/L258F) 和 RML (P209F/L258F), 它们对中长链的对硝基苯酯的比活分别提高了 7.13 倍 (C6)、2.94 倍 (C8)、6.16 倍 (C6)、3.98 倍 (C6)。以脂肪酶 RML 为例, P209 和 L258 都位于 RML 的酰基口袋的底部, RML 双突变体 (*P209F/L258F*) 中的 Phe209 破坏了 Pro209 与 Arg178 之间的氢键相互作用, 与 Phe215 形成了新的 π - π 键堆积相互作用, 这个 π - π 相互作用有助于稳定“盖子”在开放构象中的结构, 增加结合口袋对偏好底物的接受, 从而提高 RML 突变体 *P209F/L258F* 的催化活性。

1.2 半理性设计

半理性设计结合了理性设计与定向进化两种改造策略的优点, 在酶分子结构信息的基础上, 合理选择一至多个氨基酸作为突变靶点, 通过不同简并性的氨基酸密码子表构建小的突变文库, 降低了筛

选工作量，提高了分子改造的效率。

Yen 等^[15]分别对皱褶假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase, LIP2)底物结合口袋中的 L132 和 G450 进行定点饱和诱变,以研究这两个氨基酸对 LIP2 底物特异性的影响。LIP2 的野生型对短链的脂肪酸表现出很高的选择性,而突变体 L132A 和 L132I 的底物特异性则表现出向中长链的脂肪酸转移,这说明 L132 对 LIP2 的底物特异性具有很重要的作用。在单位点饱和突变的基础上,结合应用简并密码子、计算机预测和高通量筛选等技术的组合活性中心饱和突变(Combinatorial active-site saturation test, CAST)则是一种更高效的突变策略。Engström 等^[16]为了提高南极假丝酵母脂肪酶 A(*Candida antarctica* lipase A, CALA)对 α -取代酯的对映体选择性和催化活性,以 2-苯基丙酸对硝基苯基酯为底物,进行计算机对接分析,在底物结合口袋中选出了 4 个可能对 CALA 的对映选择性影响较大的氨基酸。在 CAST 基础上利用简并氨基酸密码子 NDT,构建了两个组合突变文库:文库 FI(Phe149 和 Ile150)和文库 FG(Phe233 和 Gly237)。在文库 FI 中筛选出活性和对映选择性都得到提高的最佳突变体 F233G,其 *E* 值高达 259,而且发生了对映体选择性的逆转。

Reetz 等^[17]于 2007 年首次提出迭代饱和突变(Iterative saturation mutagenesis, ISM)策略:选择脂肪酶活性位点中的多个位点,对其分别进行饱和突变、逐代循环;每个位点可以由 1-3 个氨基酸组成。每个位点包含的氨基酸的选择可以是临近氨基酸之间的组合,而位点之间的选择可以跨脂肪酶的酰基口袋和醇基口袋进行选择。Wu 等^[18]为了筛选出能够对 α -取代羧酸酯进行动力学拆分并具有高立体选择性的南极假丝酵母脂肪酶 B(*Candida antarctica* lipase B, CALB)突变体,他们将醇基结合口袋的相关氨基酸残基两两分成一个位点,位点 A: Trp104 / Ser105、位点 D: Ala281 / Ala282;酰基结合口袋的相关氨基酸残基分为位点 B: Leu144 / Val149、位点 C: Ile189 / Val190、位点 E: Val154 / Gln157。利用 NDT 密码子简并性对这 5 个位点进行迭代饱和和诱变(ISM),通过“A $\rightarrow$ D $\rightarrow$ B $\rightarrow$ E”的突变途径筛选出立体选择性逆转的最佳 *R*-选择性突变体 RG401;通过“D $\rightarrow$ C $\rightarrow$ B”突变途径筛选出了最佳的 *S*-选

择性突变体 SG303。其中 SG303 对 2-苯基丙酸对硝基苯酯的 k_{cat}/K_m 值是野生型的近 277 倍,突变体 RG401 对 *R*-2-苯基丙酸对硝基苯酯的活性比野生型高 15 倍。在 ISM 的基础上,Xu 等^[19]提出了聚焦合理迭代位点特异性突变(Focused rational iterative site-specific mutagenesis, FRISM)策略,通过使用高度缩减的氨基酸字母表在特定位点上构建小型突变体文库,再进行迭代突变。利用这一策略,Xu 等^[19]分别对 CALB 的酰基和醇基结合口袋进行改造,获得了 4 个立体选择性高度互补的突变体: *Mutant-RacidRalco*、*Mutant-SacidRalco*、*Mutant-RacidSalco* 和 *Mutant-SacidSalco*,它们对各自最佳对映体的选择性皆高于 90%。以上策略的运用需要了解酶的结构、催化机制和大量前期实验成果的积累作为基础,因此这项技术更适用于结构与功能已经被解析得较为透彻的酶的改造。迭代饱和和诱变策略除了能够用于提高对映体选择性外,还能用于脂肪酶的热稳定性的改造^[17]等。

2 展望

在脂肪酶的分子结构中,能够影响其催化活性等理化性质的因素主要有范德华力、离子键、氢键、盐桥、疏水相互作用、二硫键、芳香环相互作用、氨基酸残基大小等。针对底物结合结构进行改造也有导致酶活性下降甚至失活的风险。在这些影响因素中,疏水相互作用和氨基酸残基大小常常是理性设计的考虑范围,而盐桥和二硫键更适合于在脂肪酶的表面进行改造以提高其稳定性。受限于目前对酶的结构与功能的解析尚不够全面的现状,在底物结合口袋范围内,欲综合地运用以上这些影响因素,对酶的结构进行改造,以大幅改善酶的诸多催化性质,尚是一个较大的挑战。

随着越来越多酶分子改造研究资料的积累,酶的结构与功能之间的关系会越来越清晰,酶分子的改造也会更为容易。在可预期的一段时间内,针对酶的活性中心、底物结合口袋的改造仍然是目前研究的热点。一方面,要更加重视高通量筛选方法的构建,来推进定向进化策略的应用;另一方面,也要通过更多酶分子高级结构的精确解析、计算机软件更为准确的模拟以及分子对接等,提升理性设计

及半理性设计策略应用的效率。2016 年, *Nature* 发表的“*The coming of age of de novo protein design*”一文表明蛋白质设计时代的来临。借助计算机的辅助可以对蛋白质进行局部的设计改造,也可以进行全蛋白设计。在信息技术飞速发展的当今,在蛋白质物理和能量理论上发展出了许多算法,如蒙特卡罗(Monte Carlo, MC)算法及其衍生算法。基于Metropolis MC(MMC)算法的Rosetta服务器、基于副本交换(Replica exchange MC, REMC)算法的QUARK服务器等被用于改造酶的活性中心^[20-21]、蛋白质结构预测、蛋白质从头设计。甚至人工智能(机器学习、深度学习等)也被应用于酶工程^[22]。因此,值此计算机设计在蛋白质工程方面应用的迅猛发展时代,如能将计算机辅助设计技术、人工智能灵活应用于酶的底物结合口袋的改造,将加快酶分子进化的效率与进程,更好地适应酶在各方面应用中的不同需求。

参考文献

- [1] Jürgen P, Fischer M, Schmid RD. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site [J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1998, 93 (1-2): 67-80.
- [2] Turkenburg JP, Christiansen L, Huge-Jensen B, et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase [J]. *Nature*, 1990, 343 (6260): 767-770.
- [3] Lan D, Xu H, Xu JX, et al. *Malassezia globosa* MgMDL2 lipase: Crystal structure and rational modification of substrate specificity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 488 (2): 259-265.
- [4] Zhou P, Lan D, Popowicz, GM, et al. Enhancing H₂O₂ resistance of an esterase from *Pyrobaculum calidifontis* by structure-guided engineering of the substrate binding site [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101: 5689.
- [5] Brundiek H, Padhi SK, Kourist R, et al. Altering the scissile fatty acid binding site of *Candida antarctica* lipase A by protein engineering for the selective hydrolysis of medium chain fatty acids [J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2012, 114 (10): 1148-1153.
- [6] Zhao G, Wang J, Tang Q, et al. Improving the catalytic activity and thermostability of MAS1 lipase by alanine substitution [J]. *Molecular Biotechnology*, 2018, 60 (4): 319-328.
- [7] 江传欢, 徐岩, 喻晓蔚. 理性设计提高华根霉脂肪酶对不饱和长链脂肪酸的底物特异性及其在大豆油水解中的应用 [J]. *中国油脂*, 2018, 43 (10): 128-135.
- [8] Jiang C, Xu Y, Yu X. Enhancement of substrate specificity towards unsaturated long-chain fatty acids of *Rhizopus chinensis* lipase through rational design for efficient hydrolysis of soybean oil [J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43 (10): 128-135.
- [9] Magnusson AO, Rotticci-Mulder JC, Santagostino A, et al. Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B [J]. *ChemBioChem*, 2005, 6 (6): 1051-1056.
- [10] Wahab RA, Basri M, Rahman RNZRA, et al. Facile modulation of enantioselectivity of thermophilic *Geobacillus zalihae* lipase by regulating hydrophobicity of its Q114 oxyanion [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2016, 93-94: 174-181.
- [11] Wahab RA, Basri M, Rahman RNZRA, et al. Development of a catalytically stable and efficient lipase through an increase in hydrophobicity of the oxyanion residue [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 122: 282-288.
- [12] 王勤. α/β 类蛋白典型折叠中 $\pi-\pi$ 相互作用的研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2015.
- [13] Wang Q. The study of interactions in classical fold type of protein [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2015.
- [14] Kannan N, Vishveshwara S. Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins [J]. *Protein Engineering Design and Selection*, 2000, 13 (11): 753-761.
- [15] Burley S, Petsko G. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization [J]. *Science*, 1985, 229 (4708): 23-28.
- [16] Ding X, Tang XL, Zheng RC, et al. Identification and engineering of the key residues at the crevice-like binding site of lipases responsible for activity and substrate specificity [J]. *Biotechnology Letters*, 2018, 41: 137.
- [17] Yen CC, Malmis CC, Lee GC, et al. Site-specific saturation mutagenesis on residues 132 and 450 of *Candida rugosa* LIP2 enhances catalytic efficiency and alters substrate specificity in various chain lengths of triglycerides and esters [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58 (20): 10899-10905.
- [18] Engström K, Nyhlen J, Sandström AG, et al. Directed evolution of

- an enantioselective lipase with broad substrate scope for hydrolysis of α -substituted esters [J]. Journal of the American Chemical Society, 2010, 132 (20): 7038-7042.
- [17] Reetz MT, Carballeira, JD. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes [J]. Nature Protocols, 2007, 2 (4): 891-903.
- [18] Wu Q, Soni P, Reetz MT. Laboratory evolution of enantiocomplementary *Candida antarctica* lipase B mutants with broad substrate scope [J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135 (5): 1872-1881.
- [19] Xu J, Cen Y, Singh W, et al. Stereodivergent protein engineering of a lipase to access all possible stereoisomers of chiral esters with two stereocenters [J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141 (19): 7934-7945.
- [20] Li R, Wijma HJ, Song L, et al. Computational redesign of enzymes for regio- and enantioselective hydroamination [J]. Nature Chemical Biology, 2018, 14 : 664-670.
- [21] Siegel JB, Smith AL, Poust S, et al. Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(12): 3704-3709.
- [22] Li G, Dong Y, Reetz MT. Can machine learning revolutionize directed evolution of selective enzymes? [J]. Adv Synth Catal, 2019, 361 (11): 2377-2386.

(责任编辑 狄艳红)