

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐỘT BIẾN NẪM TRONG TRUNG TÂM HOẠT ĐỘNG LÊN HAI HOẠT TÍNH LIPASE VÀ GELATINASE CỦA LIPASE A TỪ *BACILLUS SUBTILIS* FS2

Nguyễn Hồng Thanh¹, Phùng Thu Nguyệt¹, Karl Hult², Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Khoa học và Công nghệ Hoàng gia Thụy Điển (KTH), Stockholm, Thụy Điển

TÓM TẮT

Lipase A tái tổ hợp (rLipA) từ *Bacillus subtilis* FS2 được xác định là có đồng thời cả hai hoạt tính lipase và gelatinase, trong đó gelatinase là hoạt tính phụ của enzyme này. Các đột biến trong trung tâm hoạt động của lipase là S77C, D133N và H156N đã được tạo ra bằng phương pháp Mega-primer. Cả ba dòng đột biến đều đã được tách dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Tuy nhiên chỉ có hai dòng đột biến S77C và H156N được tinh sạch còn đột biến D133N bị biểu hiện dưới dạng không tan. Các thông số động học K_m và V_{max} đối với hai hoạt tính lipase và gelatinase của dòng tái tổ hợp đã được xác định và so sánh với các dòng đột biến. Hai đột biến S77C và H156N đã làm mất hoàn toàn hoạt tính lipase nhưng đột biến S77C lại làm tăng hoạt tính phụ gelatinase lên khoảng 20 lần. Các đột biến tại trung tâm hoạt động của lipase đã làm thay đổi cấu hình không gian và mạng lưới liên kết hydro dẫn đến thay đổi khả năng liên kết giữa enzyme với cơ chất, do vậy lipase có thể dễ dàng kết hợp với cơ chất của gelatinase và thúc đẩy phản ứng phân cắt liên kết gelatin. Hoạt tính gelatinase của rLipA có thể được quyết định bởi một số các gốc amino acid khác trong trung tâm hoạt động của enzyme này.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, đột biến điểm, gelatinase, hoạt tính phụ, lipase

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, một số enzyme đã được xác định có khả năng xúc tác nhiều hơn một phản ứng hóa học tùy thuộc vào điều kiện phản ứng. Đặc tính này của enzyme được gọi là hoạt tính phụ (enzyme promiscuity) (Copley, 2003). Thông thường mỗi enzyme chỉ xúc tác đặc hiệu với một kiểu tạo thành hay phân cắt các liên kết trong điều kiện phản ứng nhất định. Tuy nhiên một số enzyme lại có khả năng phân cắt nhiều kiểu liên kết khác nhau, ví dụ như chymotrypsin có thể tham gia phản ứng thủy phân các liên kết amin, ester, thiol ester và anhydries. Mặc dù các cơ chất của enzyme này được tạo thành bởi các liên kết khác nhau (như liên kết C - N, C = O, C - S) nhưng quá trình phản ứng của enzyme với cơ chất đều phải trải qua trạng thái trung gian giống nhau ở trung tâm hoạt động làm thay đổi các lực liên kết để tấn công vào các nguyên tử dẫn đến các kiểu phân cắt khác nhau, do vậy một enzyme có thể thủy phân một số loại cơ chất. Theo các nghiên cứu trên thế giới thì một số enzyme cũng có hoạt tính phụ như lipase B của *Candida antarctica* (CALB) (Takwa *et al.*, 2006), esterase của *B. subtilis* (Kourist *et al.*, 2008), alanine dehydrogenase của *Salwalnella* sp. Ac10 (O' Brien *et al.*, 1999) và penicilin G acylase của *Aspergillus oryzae* (Wu *et al.*, 2006).

Đa số các enzyme sau khi được tách chiết khỏi cơ thể sinh vật và hoạt động ở môi trường *in vitro* thì điều kiện phản ứng và các cơ chất thường không giống với điều kiện *in vivo*. Do đó một số enzyme có khả năng thay đổi tính đặc hiệu cơ chất để thích nghi được với các điều kiện phản ứng không tự nhiên như trong phòng thí nghiệm và trong công nghiệp, vì vậy một số enzyme có thể có hoạt tính phụ (Khersonsky *et al.*, 2006). Hoạt tính phụ của enzyme thường có vai trò quan trọng trong quá trình xúc tác sinh học và trong quá trình chuẩn bị enzyme để tổng hợp các hợp chất hữu cơ (Kazlauskas, 2005).

Lipase A của *B. subtilis* FS2 là một enzyme thuộc họ α/β hydrolase tham gia thủy phân triacylglycerol thành glycerol và acid béo (Schrag, Cygler, 1997). Gen *lipA* của *B. subtilis* FS2 có độ tương đồng cao so với trình tự của gen *lipA* từ *B. subtilis* 168 là 98% và độ tương đồng của trình tự amino acid là 99%. Trung tâm hoạt động của enzyme bao gồm 3 amino acid ở vị trí Ser77, Asp133 và His156 (Pouderoyen *et al.*, 2001). Mỗi amino acid giữ một vai trò nhất định trong việc tham gia vào quá trình liên kết với cơ chất và xúc tác phản ứng. Việc làm thay đổi các gốc amino acid này của enzyme có thể dẫn đến thay đổi hoạt tính xúc tác và tính đặc hiệu cơ chất. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã phát hiện được LipA tái tổ hợp của *B.*

subtilis FS2 đồng thời có cả hai hoạt tính lipase và gelatinase, trong đó gelatinase là hoạt tính phụ của lipase (Phung *et al.*, 2008). Berglund và đồng tác giả (2005) cho rằng việc tạo đột biến tại trung tâm xúc tác có thể làm tăng các hoạt tính phụ của enzyme. Do vậy để nghiên cứu ảnh hưởng của các gốc xúc tác trong trung tâm hoạt động lên hai hoạt tính lipase và gelatinase, chúng tôi đã tiến hành tạo các đột biến điểm Ser77 thành Cys (S77C), Asp133 thành Asn (D133N) và His156 thành Asn (H156N). Ảnh hưởng của từng đột biến lên hai hoạt tính lipase và gelatinase được xác định dựa trên sự so sánh các thông số động học của dòng tái tổ hợp và các dòng đột biến.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* FS2 do TS. Tô Kim Anh, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội cung cấp.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α (*endA1 recA1 hsdR17 supE44 gypA96 thi-1 relA1 Δ lacU169 (ϕ 80 lacZAM15)*) dùng để tách dòng gen.

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) dùng để biểu hiện gen.

Các môi trường LB đặc có chứa các cơ chất 0,1% tributyrin hoặc 0,3% collagen không tan kiểu I biến tính (Sigma, Mỹ).

Đệm phosphate: 50 mM Na-PO $_4$, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazole, pH 7,5. Đệm đầy có thành phần giống đệm phosphate nhưng nồng độ imidazole là 500 mM.

Tạo đột biến bằng mega-primer

Các môi đặc hiệu mang đột biến được thiết kế có kích thước khoảng 25 - 30 bp theo chiều 5' - 3'. Phản ứng PCR được tiến hành sử dụng các môi đột biến tương ứng kết hợp với cặp môi đặc hiệu được thiết kế theo chiều ngược lại để tạo ra các đoạn DNA mang trình tự đột biến. Sản phẩm PCR của lần chạy 1 (các mega-primer) được tinh sạch và tái sử dụng làm môi cho chu trình PCR tiếp theo tạo nên đoạn gen hoàn chỉnh chứa các đột biến mong muốn (Sarkar, Sommer, 1990). Sản phẩm PCR chứa các đột biến được tách dòng vào vector pBluescript SK+ và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α .

Xác định trình tự gen

Trình tự DNA được xác định trên máy xác định

trình tự DNA tự động ABI Prism 3100 Sequencer tại Viện Công nghệ sinh học. Các hóa chất sử dụng là bộ hóa chất chuẩn Thermo sequenase cycle sequencing kit của hãng Pharmacia Biotech (Mỹ).

Biểu hiện và tinh sạch các đột biến

Gen *lipA* mang các đột biến trong vector pET22b+ được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Các thể biến nạp được biểu hiện ở điều kiện tối ưu là 28°C và nồng độ IPTG là 0,5 mM. Protein tái tổ hợp chứa các đột biến được kiểm tra trên gel polyacrylamide.

Các LipA đột biến được biểu hiện đều có chứa trình tự polyhistidin ở đầu C (His-tag) và được tinh sạch qua cột His-Trap. Protein tái tổ hợp có ái lực cao với ion Ni $^{2+}$ được thu lại bằng đệm phosphate có chứa 500 mM imidazole.

Xác định hoạt tính lipase

Hoạt tính thủy phân cơ chất *p*-nitrophenylbutyrate (PNPB) được xác định ở 30°C trong môi trường đệm chứa 50 mM Na-PO $_4$, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5. PNPB được hòa tan trong acetonitrile (AcN) và pha loãng ở các nồng độ khác nhau. Thành phần phản ứng bao gồm: 800 μ l đệm, 100 μ l enzyme tinh sạch (1 mg/ml) và bổ sung 100 μ l cơ chất PNPB. Sản phẩm của phản ứng tạo thành là *p*-nitrophenol được đo ở bước sóng 405 nm với hằng số hấp thụ $\epsilon_{405} = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Molar extinction coefficient). Tốc độ phản ứng của enzyme được xác định là lượng enzyme cần thiết giải phóng ra 1 μ mol sản phẩm *p*-nitrophenol trong một phút ở điều kiện chuẩn.

Xác định hoạt tính gelatinase

Hoạt tính gelatinase được xác định bằng bộ kit "EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay kit" của hãng Molecular Probe (Mỹ). Bộ kit này sử dụng cơ chất DQ gelatin đã được gắn phân tử huỳnh quang. Sau khi phản ứng xảy ra, DQ-gelatin bị thủy phân giải phóng phân tử huỳnh quang. Các phân tử này sẽ hấp phụ ánh sáng ở bước sóng 485 nm và phát xạ ở bước sóng 535 nm. Cường độ phát xạ ở bước sóng 535 nm phản ánh tốc độ phản ứng của enzyme. Phản ứng được tiến hành trên đĩa 96 giếng và đo bằng máy huỳnh quang (Fluoroskans plate reader) ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Thành phần phản ứng bao gồm: 70 μ l đệm phản ứng pH 7,6; 20 μ l enzyme tinh sạch nồng độ 1 mg/ml và 10 μ l cơ chất DQ-gelatin 100 mM. Hoạt tính của enzyme được xác định là lượng enzyme cần thiết để giải phóng ra 1 μ mol sản phẩm trong 1 phút ở điều kiện chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

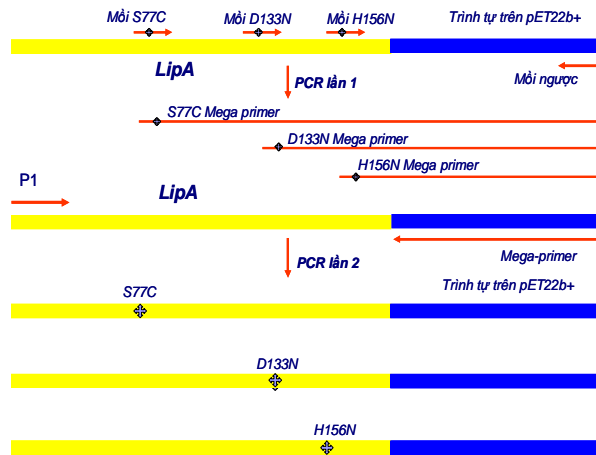
Gây đột biến điểm tại trung tâm hoạt tính

Hoạt tính xúc tác của enzyme được quyết định bởi một số các amino acid phân bố tại các vị trí trong trung tâm hoạt động. Việc thay đổi các amino acid tại trung tâm hoạt tính sẽ làm thay đổi hoạt tính xúc tác của enzyme theo nhiều hướng khác nhau. Để nghiên cứu vai trò của các gốc xúc tác trong trung tâm hoạt động của lipase tái tổ hợp từ *B. subtilis* FS2 lên hai hoạt tính lipase và gelatinase, chúng tôi đã tạo ba đột biến điểm là S77C, D133N và H156N bằng phương pháp mega-primer. Toàn bộ quy trình tạo đột biến của LipA được thể hiện trong hình sau:

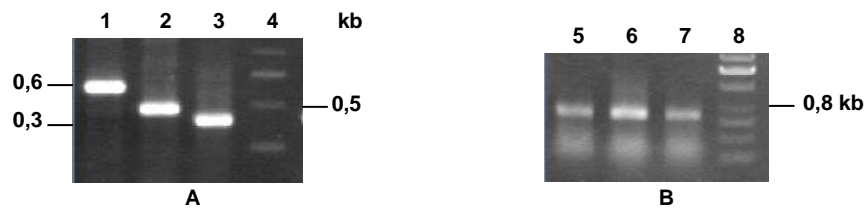
Plasmid pET22-*lipA* của chủng *B. subtilis* FS2 được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR tạo mega-primer. Theo tính toán lý thuyết sản phẩm tạo thành có kích thước lần lượt là 0,3 kb; 0,5 kb; 0,6 kb

tương ứng với các mega-primer mang đột biến H156N, D133N và S77C. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di kiểm tra trên gel 0,8% agarose.

Kết quả điện di trên hình 2A cho thấy đã nhân thành công các đoạn mega-primer mang các trình tự đột biến có kích thước đúng như tính toán lý thuyết. Sản phẩm của quá trình này được sử dụng cho phản ứng PCR tiếp theo để nhân toàn bộ đoạn gen *lipA* hoàn chỉnh mang các đột biến mong muốn. Gen *lipA* có kích thước khoảng 0,6 kb, tuy nhiên để thuận lợi cho quá trình tạo đột biến các mega-primer, chúng tôi đã thiết kế mỗi ngược có trình tự nằm trên vector pET22b+. Do đó sản phẩm PCR lần 2 theo tính toán lý thuyết sẽ có kích thước khoảng 0,8 kb. Kết quả điện di hình 2B cho thấy, sản phẩm PCR có một băng đặc hiệu tương ứng với kích thước theo tính toán lý thuyết. Các kết quả trên cho thấy cả 3 đột biến S77C, D133N và H156N đã được nhân lên thành công và chu trình PCR để nhân các đột biến là đặc hiệu với gen *lipA*.



Hình 1. Quy trình tạo đột biến bằng phương pháp mega-primer.



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR trên gel 0,8% agarose. A: Sản phẩm PCR lần 1; B: Sản phẩm PCR lần 2. 1 - 3: Các mega-primer S77C, D133N, H156N; 5 - 7: Các dòng gen đột biến S77C, D133N, H156N; 4, 8: Thang DNA chuẩn 1 kb.

Xác định trình tự các đột biến

Sản phẩm PCR chứa các đột biến được đưa vào vector pBluescript SK+ để tách dòng. Một số khuẩn lạc của dòng đột biến được chọn lọc để tách chiết và cắt kiểm tra bằng các enzyme hạn chế. Kết quả là chúng tôi đã chọn được khoảng 12 dòng tái tổ hợp mang gen đột biến. Các dòng đột biến này tiếp tục được kiểm tra trình tự trên máy ABI Prism 3001. Kết quả đọc trình tự của một số dòng đột biến (mLipA) đã được chọn lọc và so sánh với dòng chưa đột biến (rLipA) (Hình 3).

Các trình tự amino acid của các dòng đột biến đã được dịch mã và so sánh với trình tự amino acid ban đầu của dòng chưa đột biến. Kết quả đọc trình tự trên

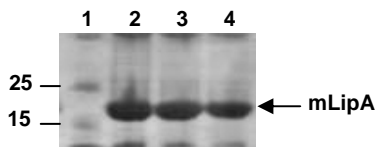
hình 3 cho thấy đã có sự thay thế các amino acid ở các vị trí S77C, D133N và H156N, như vậy các dòng gen *lipA* đã chứa các đột biến tại các vị trí như mong muốn.

Biểu hiện và tinh sạch các dòng đột biến trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

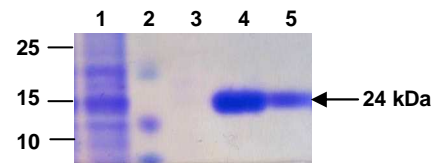
Sau khi tách dòng thành công các đột biến S77C, D133N, H156N, chúng tôi biểu hiện để thu nhận được các dòng đột biến tái tổ hợp. Các gen bị đột biến được chuyển vào vector pET22b(+) và biến nạp vào trong *E. coli* BL21 (DE3). Quá trình biểu hiện được cảm ứng bởi IPTG nồng độ 0,5 mM ở 28°C trong 5 h. Kết quả biểu hiện được thể hiện trên hình 4.

mLipA	92 KVLDETGAKKVDIVAHC MC GGANTLYYI	65 KVLDETGAKKVDIVAHSMGGANT	LYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANR
rLipA	61 KVLDETGAKKVDIVAH SMC GGANTLYYI	61 KVLDETGAKKVDIVAHSMGGANT	LYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANR
	*****	*****	*****
	S77C	D133N	H156N
mLipA	152 QKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGAR	125 QKILYTSIYSSANMIVMNYLSRL	DGARNVQIHGVGN I GLLMSSQVNS
rLipA	121 QKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGAR	121 QKILYTSIYSSADMIVMNYLSRL	DGARNVQIHGV GHI GLLMSSQVNS
	*****	*****	*****

Hình 3. So sánh trình tự amino acid của các dòng đột biến (mLipA) với dòng chưa đột biến (rLipA).



Hình 4. Điện di protein biểu hiện của các dòng đột biến trên gel polyacrylamide. 1. Thang protein chuẩn; 2 - 4. Các dòng đột biến S77C, D133N và H156N.



Hình 5. Điện di sản phẩm tinh sạch các đột biến. 1. LipA tái tổ hợp tổng số; 2. Thang protein chuẩn; 3. Tinh sạch đột biến D133N; 4. Tinh sạch đột biến S77C; 5. Tinh sạch đột biến H156N.

Kết quả điện di trên hình 4 cho thấy cả 3 dòng đột biến S77C, D133N và H156N đều được biểu hiện tốt với băng protein tái tổ hợp có kích thước 24 kDa đúng như tính toán lý thuyết. Như vậy điều kiện cảm ứng và nồng độ IPTG là thích hợp cho quá trình biểu hiện các dòng đột biến. Điều này cho thấy các đột biến đã không làm ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp protein.

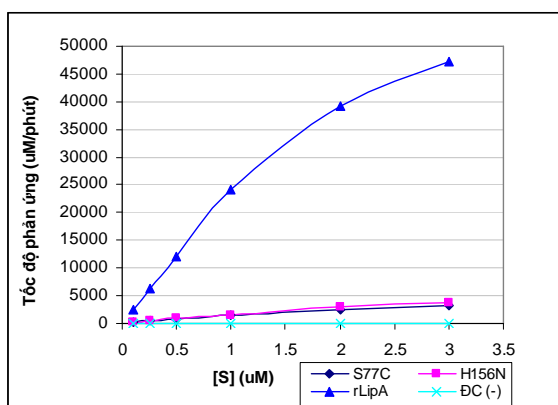
Protein rLipA sau khi được biểu hiện ở trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) được vận chuyển ra khoang chu chất nhờ tín hiệu tiết *pelB*. Protein tổng số được

giải phóng ra khỏi tế bào nhờ quá trình phá tế bào bằng siêu âm trong đệm phá tế bào. Protein LipA được thiết kế gắn thêm 6 gốc His nằm ở đầu C do đó có ái lực mạnh với ion Ni^{2+} và thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp. Toàn bộ protein tổng số đã được đưa lên cột sắc ký ái lực His-Trap trên hệ thống sắc ký AKTA (Amersham Bioscience, Mỹ) và sử dụng phần mềm UNICORN 4.0. Kết quả tinh sạch các đột biến trên hình 5 cho thấy ở đường chạy 4 và 5 tương ứng với các dòng đột biến S77C và H156N có một băng protein với kích thước tương ứng khoảng 24

kDa, chứng tỏ cả 2 dòng đột biến này đã được tinh chế. Tuy nhiên, ở đường chạy số 3 không thấy xuất hiện băng protein ở vị trí tương ứng, do đó không thu được protein đột biến D133N như mong muốn. Kết quả này đã được kiểm tra lại bằng quy trình xử lý protein tan cho thấy dòng đột biến D133N đã bị biểu hiện dưới dạng thể vùi (inclusion body). Khi đó, protein bị đóng gói không đúng cấu trúc và dễ bị mất hoạt tính. Điều này có thể được giải thích là do đột biến tại vị trí Asp133 thành Asn làm cho cấu trúc cuộn xoắn của protein bị thay đổi dẫn đến protein tái tổ hợp bị biểu hiện dưới dạng không tan. Hai đột biến còn lại là S77C và H156N sau khi tinh sạch đã được tiến hành loại muối để xác định hoạt tính enzyme ở bước tiếp theo.

So sánh hoạt tính lipase tái tổ hợp và các đột biến

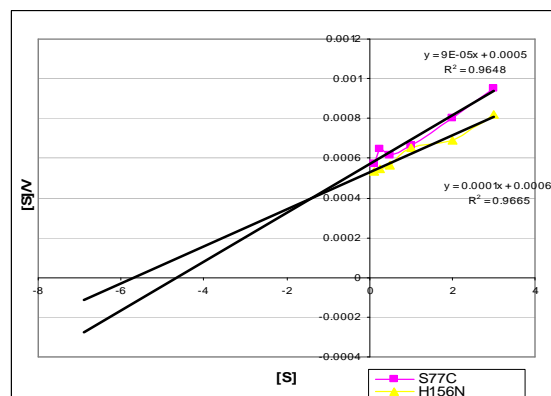
Do trong quá trình tinh sạch chúng tôi chỉ thu được 2 dòng đột biến S77C và H156N, vì vậy, chúng tôi xác định và so sánh hoạt tính lipase tái tổ hợp chưa đột biến và 2 dòng đột biến nói trên. Hoạt tính thủy phân của LipA và các dòng đột biến được xác định với cơ chất là *p*-nitrophenyl butyrate (PNPB) trong 10% AcN. Sản phẩm tạo thành là *p*-nitrophenol được đo ở bước sóng 405 nm. Các thông số động học được tính toán dựa vào tốc độ phản ứng của enzyme tại các nồng độ cơ chất khác nhau. Kết quả xác định hoạt tính LipA được thể hiện trên hình 6.



Hình 6. So sánh hoạt tính lipase của dòng tái tổ hợp và dòng đột biến.

Kết quả so sánh hoạt tính của các dòng S77C và H156N với dòng tái tổ hợp (rLipA) trên hình 6 cho thấy hoạt tính của các dòng bị đột biến đã bị mất gần như hoàn toàn và gần với đường đối chứng âm trong khi đó hoạt tính của rLipA cao hơn hẳn so với các

dòng đột biến. Tuy cả hai dòng đột biến S77C và H156N đều làm giảm đáng kể hoạt tính lipase so với lipase tái tổ hợp nhưng ở mỗi dòng đột biến thì cơ chế ảnh hưởng đến khả năng xúc tác là khác nhau.



Hình 7. Đồ thị mô tả phương trình động học Hanes-Wilkinson đối với hoạt tính lipase của các dòng đột biến.

Giá trị K_m thể hiện ái lực giữa enzyme với cơ chất, giá trị K_m càng nhỏ thì ái lực liên kết giữa enzyme với cơ chất càng lớn. Theo kết quả trên bảng 1 thì K_m của S77C và H156N lớn hơn so với K_m của rLipA, chứng tỏ khi bị đột biến thì ái lực giữa enzyme với cơ chất bị giảm một cách rõ rệt, do vậy đã làm giảm tốc độ phản ứng. Kết quả này cho thấy các đột biến thay thế các vị trí xúc tác trong trung tâm hoạt động đã ảnh hưởng rất lớn đến khả năng xúc tác của enzyme. Theo cơ chế xúc tác của lipase, khi cơ chất liên kết với enzyme, gốc Ser77 được hoạt hóa và tấn công trực tiếp vào nguyên tử carbon của cơ chất. Sau đó trạng thái chuyển tiếp giữa enzyme với cơ chất được hình thành và bền vững bởi một số các liên kết hydro. Gốc His156 sẽ chuyển tiếp proton từ nhóm OH của Ser77 và cắt nhóm alcohol ra khỏi cơ chất. Vì vậy mà khi các nhóm chức của các gốc xúc tác bị thay đổi sẽ dẫn đến ái lực giữa enzyme-cơ chất bị giảm đáng kể. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các công trình công bố trước đây của Eggert và đồng tác giả (2001) khi tạo đột biến 3 gốc xúc tác tại tâm hoạt tính S78C, D134N và H157N của LipB đều làm giảm hoạt tính lipase rất nhiều lần so với chủng đại. Quá trình đột biến thay thế lần lượt từng amino acid riêng lẻ đã tác động làm thay đổi ái lực liên kết giữa enzyme với cơ chất dẫn đến sự thay đổi về cấu trúc không gian của trung tâm xúc tác, từ đó làm giảm mức độ đặc hiệu của cơ chất nên hoạt tính enzyme bị giảm.

Bảng 1. Các thông số động học đối với hoạt tính lipase của dòng đột biến và rLipA.

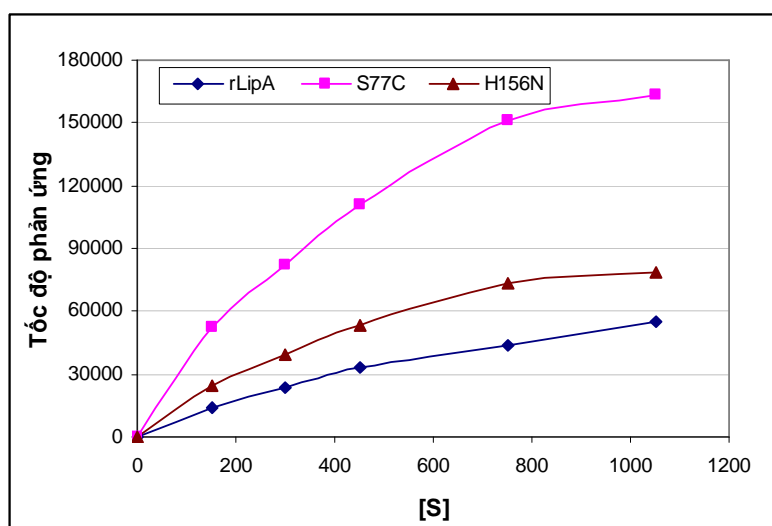
Thông số	S77C	H156N	rLipA
V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}$)	10000	11111,11	200000
K_m (mM)	6	5,55	4,18

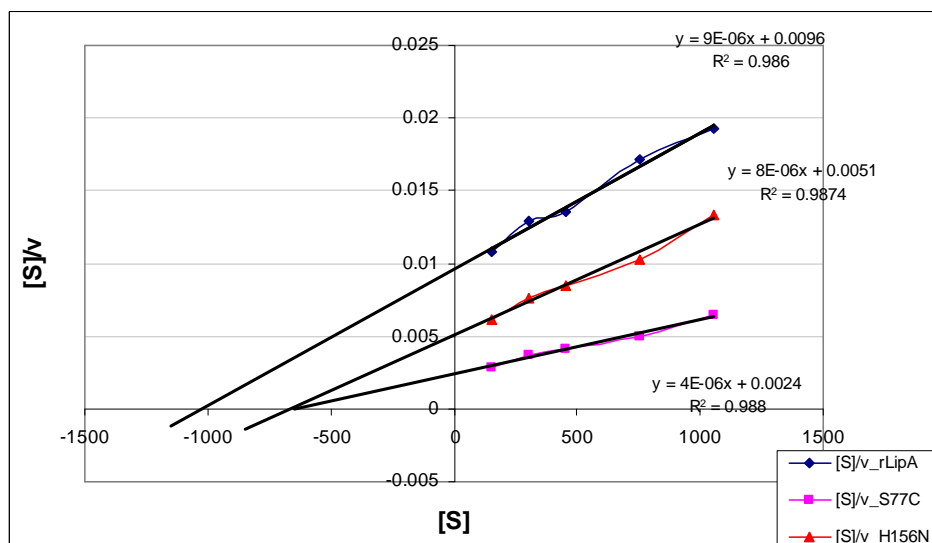
Xác định hoạt tính gelatinase của các đột biến

Bên cạnh nghiên cứu xác định ảnh hưởng các đột biến lên hoạt tính lipase, chúng tôi cũng tiến hành tương tự để xác định ảnh hưởng của các đột biến lên hoạt tính gelatinase. Hoạt tính gelatinase được xác định dựa vào khả năng thủy phân cơ chất có gắn fluorescein DQ-gelatine với cường độ phát xạ ở bước sóng 535 nm. Tốc độ xúc tác của enzyme được xác định tại các nồng độ cơ chất khác nhau phản ánh các thông số động học của enzyme. Các dòng đột biến được xác định hoạt tính trong cùng một điều kiện và so sánh với hoạt tính của LipA tái tổ hợp.

Kết quả trên hình 8 cho thấy, cả hai đột biến S77C và H156N đều có hoạt tính gelatinase cao hơn hẳn so với hoạt tính gelatinase của lipase tái tổ hợp. Kết quả này ngược lại so với kết quả so sánh hoạt tính lipase của các dòng đột biến và dòng tái tổ hợp. Gốc Ser77 là gốc amino acid quan trọng nhất trong 3 gốc xúc tác do khả năng tham gia trực tiếp vào việc

tạo liên kết giữa cơ chất và enzyme. Khi gốc Ser được hoạt hóa bởi phản ứng chuyển điện tử từ nguyên tử oxy (nhân tố cho điện tử), nó sẽ làm giàu điện tử cho nguyên tử carbon ở vị trí α . Việc làm đột biến gốc S77 thành C77 đã làm mất khả năng cho điện tử từ nguyên tử oxy để phân cắt liên kết giữa C α - β của cơ chất, vì vậy hoạt tính lipase bị mất hoàn toàn. Trong khi đó đột biến S77C lại làm tăng hoạt tính gelatinase, có nghĩa là tăng khả năng phân cắt liên kết C-N của cơ chất gelatin. Gelatinase là enzyme thuộc họ serine protease và trong cấu trúc của enzyme này cũng có 3 gốc xúc tác Ser-His-Asp (hay Glu), vì vậy cơ chế hoạt động của gelatinase gần giống với cơ chế xúc tác của lipase. Việc tạo đột biến S77C làm tăng hoạt tính gelatinase cho thấy có thể có một gốc Ser khác đóng vai trò cho điện tử và được hoạt hóa để phản ứng phân cắt liên kết C-N của gelatin có thể xảy ra. Như vậy, có thể hoạt tính gelatinase được quyết định bởi một số các gốc amino acid khác trong trung tâm hoạt động của lipase.

**Hình 8.** Đồ thị so sánh hoạt tính gelatinase của rLipA và các dòng đột biến.



Hình 9. Đồ thị mô tả phương trình động học Hanes-Wilkinson đối với hoạt tính gelatinase của rLipA và các dòng đột biến.

Bảng 2. Các thông số động học hoạt tính gelatinase của dòng bị đột biến và rLipA.

Thông số	S77C	H156N	rLipA
V _{max} (μM/min)	250000	125000	111111
K _m (mM)	0,6	0,637	1,066

Các giá trị K_m và V_{max} trên bảng 2 cho thấy giá trị K_m của các dòng đột biến thấp hơn so với dòng tái tổ hợp. Kết quả này đã phản ánh ái lực liên kết của các dòng đột biến với cơ chất gelatin được tăng lên, do vậy làm tăng hoạt tính thủy phân liên kết C-N của gelatin lên khoảng 20 lần. Điều này cho thấy khi thay đổi các nhóm chức của các gốc xúc tác nằm trong trung tâm hoạt động của enzyme thì đã làm thay đổi cấu hình không gian của nó, do đó tạo nên cấu hình phù hợp với cơ chất gelatin hơn là cấu hình không gian ban đầu của lipase. Vì vậy, cơ chất dễ dàng đi vào trung tâm xúc tác tạo phức enzyme-cơ chất, thúc đẩy quá trình xúc tác diễn ra nhanh hơn. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kazlauskas (2005) cho rằng hoạt tính phụ của enzyme thường ở trạng thái tiềm ẩn. Tuy nhiên, khi tạo đột biến vào trung tâm xúc tác của enzyme thì thường làm mất đi hoạt tính chính và hoạt tính phụ của một số enzyme lại có thể được tăng lên. Việc thay đổi các nhóm chức ở các gốc xúc tác có thể làm thay đổi kiểu phản ứng ưa thích của enzyme do nó mở rộng không gian ở bề mặt cho phép cơ chất liên kết trực tiếp với trung tâm hoạt động của enzyme.

Hiện tượng hoạt tính phụ gelatinase của rLipA tương tự như hoạt tính phụ amidase của esterase từ *B. subtilis* (Kourist *et al.*, 2008). Thông thường các enzyme lipase và esterase tham gia phản ứng thủy phân cắt liên kết C = O của triacylglyceride trong khi gelatinase hay amidase tham gia phản ứng phân cắt liên kết C - N. Mặc dù quá trình thủy phân các liên kết C = O và C - N là hoàn toàn khác nhau nhưng cơ chế xúc tác của các enzyme lại tương đối giống nhau do các enzyme thuộc họ serine protease đều có 3 gốc xúc tác Ser-His-Asp (hay Glu) nằm ở tâm hoạt tính giống lipase. Như vậy, có thể hoạt tính gelatinase của lipase hay hoạt tính amidase của esterase đều ở trạng thái ẩn và bền vững tạm thời của trạng thái chuyên tiếp.

KẾT LUẬN

Việc tạo các đột biến điểm S77C và H156N trong trung tâm hoạt động của lipase A tái tổ hợp đã làm ảnh hưởng tới cả hai hoạt tính lipase và gelatinase. Hai đột biến S77C và H156N đã làm mất hoàn toàn hoạt tính lipase nhưng đột biến S77C lại làm tăng hoạt tính phụ gelatinase lên khoảng 20 lần. Hoạt tính gelatinase có thể ở trạng thái ẩn của trạng thái chuyên tiếp và một số amino acid khác trong trung tâm hoạt động của lipase có vai trò quan trọng đối với hoạt tính này. Kết quả này đã mở ra triển vọng mới về nghiên cứu tạo đột biến làm tăng hoạt tính gelatinase của lipase A tái tổ hợp.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của Dự án hợp tác nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển mã số VS/BT-03 “Nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp ứng dụng trong nông nghiệp và y dược”. Trong quá trình thực hiện, đề tài có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berglund P, Park S (2005) Strategies for altering enzyme reaction specificity for applied biocatalysis. *Curr Org Chem* 9: 325-336.

Copley SD (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol* 7: 265-272.

Eggert T, Van PG, Dijkstra BW, Jaeger KE (2001) Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. *FEBS Let* 502: 89-92.

Hult K, Berglund P (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol* 25: 231-238.

Kazlauskas RJ (2005) Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 9: 195-201.

Khersonsky O, Roodveldt C, Tawfik DS (2006) Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr Opin Chem Biol* 10: 498-508.

Kourist R, Bartsch S, Fransson L, Hult K, Bornscheuer UT (2008) Understanding promiscuous amidase activity of an esterase from *Bacillus subtilis*. *Chem Biol Chem* 9: 67-69.

O'Brien PJ, Herschlag D (1999) Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem Biol* 6: 91-105.

Phung TN, Nguyen HT, Truong NH, Jan CJ (2008) Studies on a novel recombinant LipA from *Bacillus subtilis* FS2. *J Sci Tech Dev* 25(2): 333-340.

Pouderoyen G, Eggert T, Jaeger KE (2001) The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. *J Mol Biol* 309: 215-226.

Sarkar G, Sommer SS (1990) The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. *Biotechnology* 8: 404-407.

Schrag JD, Cygler M (1997) Lipases and α/β hydrolase fold. *Methods Enz* 284: 85-107.

Takwa M, Simpson N, Hult K, Martinelle M (2006) One-pot difunctionalization of poly(pentadecalactone) with thiol-thiol or thiol-acrylate groups, catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Macro Rap Commun* 27: 1932-1936.

Wu WB, Xu JM, Wu Q, Lv DS, Lin XF (2006) Promiscuous acylases-catalyzed Markovnikov addition of N-heterocycles to vinyl esters in organic media. *Adv Syn Cat* 348: 487-492.

THE IMPACT OF MUTANTION IN THE ACTIVE SITE TO LIPASE AND GELATINASE ACTIVITIES OF LIPASE A FROM *BACILLUS SUBTILIS* FS2

Nguyen Hong Thanh¹, Phung Thu Nguyet¹, Karl Hult², Truong Nam Hai^{1,*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden

SUMMARY

Recombinant lipase A (rLipA) from *Bacillus subtilis* FS2 was determined to have both lipase and gelatinase activities, in which gelatinase is promiscuous activity of this enzyme. Mutants S77C, D133N and H156N in the active site of lipase were created using mega-primer method. Three mutants were cloned and successfully expressed in the cells *E. coli* BL21 (DE3). However, only two mutants S77C and H156N were successfully purified for activity assays whereas mutant D133N existed in insoluble form. Kinetic parameters K_m and V_{max} for lipase and gelatinase activity of recombinant protein (rLipA) were calculated and compared to that of mutants. Mutants S77C and H156N showed remarkably decreased lipase activity however S77C increased gelatinase activity in 20 folds. Possible explanation might be that mutants at the active site of rLipA altered dimension structure and hydrogen bonding network of enzyme result in the changing of enzyme-substrate binding, thereby lipase would bind to gelatin and facilitate for cleavage reaction. The amino acids potential for gelatinase activity might be located in other sites in the active site of this enzyme.

Keywords: *Bacillus subtilis*, gelatinase, lipase, promiscuous, site-directed mutagenesis

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37562790; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn