

产碱假单胞菌碱性脂肪酶的克隆表达及酶学性质* Gene Cloning, Expression and Characterization of An Alkaline Lipase from *Pseudomonas alcaligenes* PA-9

刘滔滔^{1,2}, 刘明瑞^{1,2}, 刘恒嘉^{1,2}, 杜丽琴^{1,2}, 梁智群^{1,2}, 韦宇拓^{1,2**}

LIU Taotao^{1,2}, LIU Mingrui^{1,2}, LIU Hengjia^{1,2}, DU Liqin^{1,2}, LIANG Zhiqun^{1,2}, WEI Yutuo^{1,2}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; 2. 亚热带农业资源保护与利用国家重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. College of Life Science & Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要:【目的】为获得可应用于酯类水解及合成的脂肪酶资源, 本研究通过筛选分离得到能够水解长链脂肪酸酯的脂肪酶产生菌, 克隆表达其脂肪酶基因并研究脂肪酶的酶学性质。【方法】从环境中筛选分离出可水解三硬脂酸甘油酯的菌株, 利用 16S rDNA 对其进行分子鉴定, 并扩增其脂肪酶基因和脂肪酶分子伴侣基因。以 pET-22b(+) 为表达载体, 构建共表达重组质粒, 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3) 进行异源表达, 并对重组酶进行酶学性质研究。【结果】经 16S rDNA 鉴定该菌株为产碱假单胞菌 *Pseudomonas alcaligenes*。通过 PCR 成功克隆到该菌的脂肪酶基因 (*lipPA-9A*) 和脂肪酶分子伴侣基因 (*lipPA-9B*), 并构建共表达重组质粒 pET22b-*lipPA-9A-9B*, 实现脂肪酶 LIP-9A 的活性表达。酶学性质研究表明 LIP-9A 的最适反应温度为 35℃, 最适反应 pH 值为 10.5, 最适反应底物为对硝基苯酚辛酸酯 (pNPO); 同时, LIP-9A 还可以催化醇和羧酸发生酯化反应产生酯类物质。【结论】LIP-9A 在碱性条件下具有较高活力, 且可以催化酯化反应, 在洗涤行业和酯合成领域具有一定的应用价值。

关键词:产碱假单胞菌 碱性脂肪酶 共表达 酯化

中图分类号: Q78, TQ925⁺.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2016)03-0248-07

Abstract:【Objective】In order to obtain the lipase that can be applied to the hydrolysis and synthesis of esters, the alkaline lipase-producing strains that hydrolyze long chain fatty acid ester were screened and isolated. The related genes were cloned and expressed, and enzyme characterization was studied. 【Methods】A strain, which degraded glycerol tristearate, was isolated from the environment, and identified based on 16S rDNA sequence analyses. Then the lipase gene and the lipase chaperone gene were amplified by PCR. The target genes *lipPA-9A* and *lipPA-9B* were introduced into expression vector pET-22b(+) and induced for expression in *Escherichia coli* BL21(DE3). Finally, the characteristics of the recombinant enzyme were studied in detail. 【Results】The strain was identified as the genus of *Pseudomonas alcaligenes* by analyzing of 16S rDNA sequence. And the lipase gene (*lipPA-9A*) and lipase chaperone gene (*lipPA-9B*) were cloned. The co-expression re-

收稿日期: 2016-05-08

修回日期: 2016-06-19

作者简介: 刘滔滔 (1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事酶工程研究。

* 国家自然科学基金项目 (31460437) 资助。

** 通讯作者: 韦宇拓 (1971-), 男, 教授, 主要从事发酵与酶工程研究, E-mail: weiyutuo@gxu.edu.cn.

combinant plasmid of pET22b-*lipPA-9A-9B* was successfully constructed and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The maximum activity of LIP-9A was obtained at 35°C, pH 10.5, and pNPO was the most suitable substrate. Meanwhile, the active LIP-9A could catalyze fatty alcohols and fatty acids to generate esters. **【Conclusion】**LIP-9A is a lipase with relatively high activity in alkaline conditions and can catalyze esterification reaction. Its characteristics are of high value in the detergent industry and biocatalytic applications.

Key words: *Pseudomonas alcaligenes*, alkaline lipase, co-expression, esterification

0 引言

【研究意义】脂肪酶(EC. 3. 1. 1. 3)又称为三酰基甘油酰基水解酶,是催化甘油三酯分解成甘油和脂肪酸的酯键水解酶^[1]。脂肪酶除了能在油水界面催化酯键的水解,还能催化酸解、醇解、氨解、转酯化以及酯合成等反应^[2],从而被广泛应用于食品加工、手性拆分、洗涤和生物能源等领域。**【前人研究进展】**多数从环境中获得的脂肪酶需要通过 DNA 重组技术实现过表达,然而脂肪酶的过表达容易形成包涵体,如 Aamand 等^[3]对来自 *Pseudomonas cepacia* 的胞外脂肪酶 LipA 进行研究,发现 LipA 在缺乏脂肪酶分子伴侣蛋白 LimA 的情况下只能产生无活性脂肪酶。Jorgensen 等^[4]研究发现在洋葱伯克霍尔德菌 *lipB* 基因对脂肪酶基因 *lipA* 的活性表达是必需的。**【本研究切入点】**从环境中筛选出可水解长链脂肪酸酯的脂肪酶资源,研究酶的基本性质,降低酶的生产成本,提高酶的转化效率。**【拟解决的关键问题】**以三硬脂酸甘油酯为底物,从土壤中筛选出对长链脂肪酸酯具有较高水解能力的野生菌,克隆其脂肪酶基因并实现异源表达,再深入研究其酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

样品:广西南宁市周边采集的富油土样。

菌株和载体: *Escherichia coli* BL21(DE3)、*Escherichia coli* Rosetta (DE3)、*E. coli* Trans10、pMD19-T、pET-22b(+), pET-30a(+).

酶和试剂:限制性内切酶和 PCR 扩增聚合酶购自大连 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶购自 Toyobo 公司。质粒提取试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒以及 PCR 产物纯化试剂盒购自 BioFlux 公司。IPTG 和 X-gal 购自 Gibco 公司,三硬脂酸甘油酯购自 TCI 公司,对硝基苯酚及对硝基苯酚酯底物购自 sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

筛选平板培养基(W/V):蛋白胨 1%,酵母提取物 0.5%, NaCl 1%,琼脂粉 1.5%,底物乳化液 1%,维多利亚蓝 B 0.02%,参考文献[5]并作一定修改。

广西科学 2016年6月 第23卷第3期

橄榄油乳化液:3%(V/V)的聚乙烯醇与橄榄油以体积比 3:1 混合均匀。

三硬脂酸甘油酯乳化液:取 1 g 三硬脂酸甘油酯溶于 10 mL 3%(V/V)聚乙烯醇溶液中,溶解后再于超声波破胞仪中乳化 20 min。

1.2 方法

1.2.1 高产脂肪酶野生菌的筛选

取 5 g 土样加入 50 mL 无菌水,摇床震荡 20 min,制成菌悬液,过滤后梯度稀释上清液,并涂布橄榄油平板于 37°C 培养 48 h 进行初筛,再经三硬脂酸甘油酯平板进行复筛,最后通过摇瓶发酵测定酶活力,选择较高活力的菌株进行研究。

1.2.2 野生菌株 16S rDNA 鉴定及进化树构建

以筛选出的野生菌总 DNA(DNA 提取方法参考文献[6])为模板,利用 16S rDNA 为通用引物,进行 PCR 扩增反应,扩增产物连接 pMD19-T 载体后送测序,将测序获得的 16S rDNA 序列进行 Blast N 分析,并用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.2.3 脂肪酶基因保守区序列的克隆

检索 Genbank 数据库中已公布的产碱假单胞菌脂肪酶基因序列,比对分析寻找序列保守区。设计简并引物进行 PCR 扩增反应,扩增产物与 pMD19-T 载体连接后送测序。

1.2.4 脂肪酶基因 *lipPA-9A* 的克隆与表达

比对分析保守区序列,设计扩增 *lipPA-9A* 的引物。上游引物:5'-CCGGAATTCATGGGCCTGTTCGGCTCCACCGGCTACACCAA-3'(下划线处为 *EcoR* I 限制性酶切位点);下游引物:5'-CCCAAGCTTTCAGAGCCGCGCCAGCTTCA-3'(下划线处为 *Hind* III 限制性酶切位点)。PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后,与表达载体 pSE380 连接构建成 pSE-*lipPA-9A* 重组质粒并转入 *E. coli* BL21(DE3)中,挑选阳性克隆子接种于含有 0.1 mg/mL Amp 的 LB 培养基,37°C 培养至菌液 OD_{600} 达 0.6 左右,加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,在 20°C 条件下诱导培养 20 h,SDS-PAGE 分析其表达产物并检测粗酶活。

脂肪酶酶活力测定方法^[7-8]:以异丙醇为溶剂,配

制终浓度为 20 mmol/L 的底物溶液作为母液;取 10 μ L 底物母液与 180 μ L 反应缓冲液混匀加入 1.5 mL 离心管,预热 5 min;加入 10 μ L 酶液,空白对照用相应的缓冲液代替,在实验所需条件下反应 10 min 后,加入 200 μ L 10%(V/V)三氯乙酸溶液终止反应,静置 5 min;加入 200 μ L 10%(W/V)的 Na_2CO_3 溶液显色,混匀。用酶标仪于 405 nm 处测吸光值,参照标准曲线计算酶活力。

脂肪酶酶活力单位(U)定义:每分钟分解底物释放出 1 μ mol 对硝基苯酚(pNP)所需的酶量。

1.2.5 脂肪酶分子伴侣基因 *lipPA-9B* 的克隆表达

以筛选菌 PA-9 的总 DNA 为模板,设计引物扩增 *lipPA-9B*,上游引物:5'-CGCCATATGGTGAA-CAAGCCGCTGCTATT-3'(下划线处为 *Nde* I 限制性酶切位点);下游引物:5'-GGAAGATCTTCA-GAGTTTCTTTTCCCGGC-3'(下划线处为 *Bgl* II 限制性酶切位点)。扩增产物经 *Nde* I 和 *Bgl* II 双酶切后,与 pET-30a(+)连接构建重组质粒 pET-*lipPA-9B* 并转入 *E. coli* Rosetta (DE3)中诱导表达,表达产物命名为 LIP-9B 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.6 脂肪酶包涵体变复性验证

包涵体的变复性采用一次稀释法^[9]。将包涵体溶解于变性液,离心后取上清液进行稀释复性。用含分子伴侣 LIP-9B 的复性缓冲液分别以 25, 50, 75, 100, 150 和 300 倍稀释样品,同时以不含 LIP-9B 的复性缓冲液稀释到相同倍数作为空白对照,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 h。按 1.2.4 节下脂肪酶酶活力测定方法,以 pNPP 为底物检测酶活力。

1.2.7 *lipPA-9A* 与 *lipPA-9B* 共表达重组质粒的构建及诱导表达

lipPA-9B 和 *lipPA-9A* 分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I、*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切过夜,胶回收目的片段连接 pET-22b(+)载体,先后串联基因 *lipPA-9A* 和 *lipPA-9B* 构建共表达重组质粒 pET22b-*lipPA-9A-9B*,其中两个基因 5'端均具有 rbs 和信号肽序列,如图 1 所示。

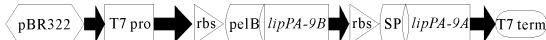


图 1 重组质粒 pET22b-*lipPA-9A-9B* 的构建

Fig. 1 The schematic of pET22b-*lipPA-9A-9B* construction pattern

将共表达质粒 pET22b-*lipPA-9A-9B* 转入 *E. coli* BL21(DE3),挑选阳性克隆子接种于含有 0.1 mg/mL Amp 的 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌液 OD_{600} 达 0.6 左右,加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 进

行诱导,20 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 20 h。胞内外重组蛋白表达情况用 SDS-PAGE 检测,并以对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)为底物检测脂肪酶活力。

1.2.8 重组酶 LIP-9A 酶学性质鉴定

(1)温度和 pH 值对 LIP-9A 酶活力的影响

以对硝基苯酚辛酸酯(pNPO)为底物,在 pH 值为 7.0 的反应缓冲液中,分别在 20~65 $^{\circ}\text{C}$ (间隔 5 $^{\circ}\text{C}$)下测定温度对酶活力的影响。在最适反应温度下,用 pH 值 6.0~12.0(间隔 0.5)的缓冲液(氢氧化钠-柠檬酸-磷酸-硼酸缓冲液,参考文献[10])稀释 LIP-9A 适当倍数,测定 pH 值对酶活力的影响。

(2)温度和 pH 值对 LIP-9A 稳定性的影响

热稳定性:以 pNPO 为反应底物,将 LIP-9A 分别在 25~55 $^{\circ}\text{C}$ (间隔 5 $^{\circ}\text{C}$)保温 1 h,在最适反应条件下测定残余酶活力。

pH 值稳定性:以 pNPO 为反应底物,用 pH 值 5.0~11.0(间隔 0.5)的缓冲液稀释 LIP-9A 相同倍数后,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 24 h,在最适反应条件下测定其残余酶活力。

(3)LIP-9A 底物特异性测定

分别以不同链长的对硝基苯酚酯(C2~C16)为底物在最适反应条件下测定重组酶酶活力,测定重组酶的最适反应底物。

(4)金属离子对重组酶 LIP-9A 活力的影响

用终浓度为 5 mmol/L 的金属离子缓冲液稀释重组酶 LIP-9A(总反应体系为 200 μ L),以不添加金属离子的酶反应液为对照组,在最适反应条件下研究金属离子对酶活力的影响。

(5)化学试剂对 LIP-9A 活力的影响

按 1%、5%和 10%(W/V)的添加比例将非离子型表面活性剂和离子型表面活性剂加到酶反应体系中(总反应体系为 200 μ L,对照组不加表面活性剂),在最适反应条件下测定相对残余酶活力。

取适量的 EDTA、DTT 和 β -巯基乙醇按终浓度 1 mmol/L、5 mmol/L 和 10 mmol/L 加到酶反应体系中(总反应体系为 200 μ L)。以未加化学试剂的为对照组,在最适反应条件下测定相对残余酶活力。

将有机试剂(甲醇、乙醇、正丁醇、正己醇、1,2-丙二醇、丙三醇、甲苯、乙腈、丙酮、DMSO、DMF、三氯甲烷、四氢呋喃、吡啶)以 10%(V/V)的比例加到 200 μ L 的反应体系中,混匀。以不加有机试剂的酶反应液为对照组,在最适反应条件下检测相对残余酶活力。

(6)重组酶 LIP-9A 酯化反应的检测

酯化反应:100 mmol/L 醇、100 mmol/L 酸、5

mL 正己烷、10 mg 酶粉(反应体系 5 mL), 35℃ 反应 10 h, 取 1 mL 反应液 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进行气相色谱分析, 对照组不添加冻干酶粉。其中, 醇包括乙醇、丁醇、己醇和辛醇, 酸包括乙酸和丁酸。酯化率通过 GC 测定醇的消耗量间接计算得出, 即酯化率 $Y = \text{消耗醇的量} / \text{加入总醇的量} \times 100\%$ 。

气相色谱检测条件: 气相色谱柱为 HP-5, 进样口温度为 240℃, 压力为 10.896 psi, 进样分流比为 20:1, 流速为 1.2 mL/min, 检测温度从 60℃ 开始, 保留 2 min, 以每分钟 20℃ 的速度升至 240℃, 检测器温度为 300℃。

2 结果和分析

2.1 高产脂肪酶产生菌的筛选

本实验利用三硬脂酸甘油酯为底物最终筛选到 6 株可水解该底物的脂肪酶产生菌(图 2)。通过摇瓶发酵检测粗酶活力, 最终筛选得到一株脂肪酶酶活力最高的菌株, 命名为 PA-9。

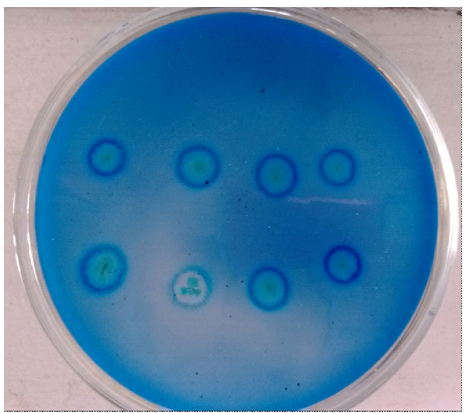


图 2 产脂肪酶菌株的筛选结果

Fig. 2 Result of screening lipase-producing microorganisms

2.2 PA-9 的分子鉴定和进化树的构建

将所得的产脂肪酶菌株 PA-9 16S rDNA 序列在 NCBI 中进行比对分析, 结果表明该序列与 *Pseudomonas alcaligenes* strain NBRC 14159 的 16S rDNA 一致性为 99%, 并构建系统发育树(图 3), 初步鉴定 PA-9 为 *Pseudomonas alcaligenes* 菌株。

2.3 脂肪酶基因的克隆表达

2.3.1 PA-9 脂肪酶基因保守区序列的克隆

利用简并引物成功克隆出一条约 500 bp 的目的片段, Blast N 分析表明保守区序列与来自 *Pseudomonas alcaligenes* NBRC 14159 的假定脂肪酶基因(putative lipase)一致性最高, 同源性为 99%, 可初步判断该片段属于脂肪酶。

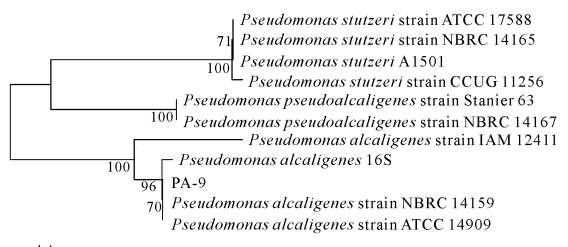
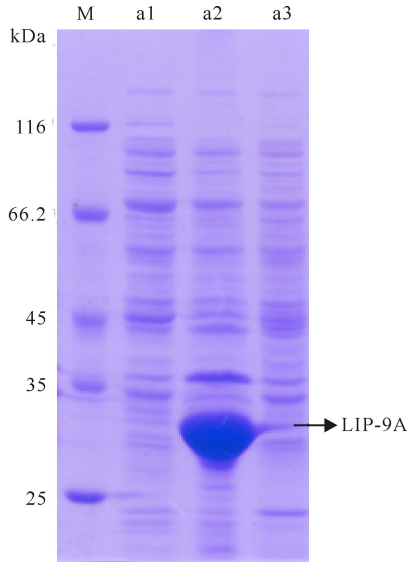


图 3 菌株 PA-9 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from 16S rDNA gene sequences of strain PA-9

2.3.2 PA-9 脂肪酶基因 lipPA-9A 克隆表达

根据保守区序列的比对分析, 以 PA-9 总 DNA 为模板, 扩增出约 900 bp 的 DNA 片段, 重组质粒 pSE-lipPA-9A 转入大肠杆菌诱导表达(图 4), SDS-PAGE 结果显示在菌体中重组蛋白条带明显, 破胞上清液没有重组蛋白表达条带, 也检测不到脂肪酶活力, 因此推断 lipPA-9A 在大肠杆菌中表达为包涵体。



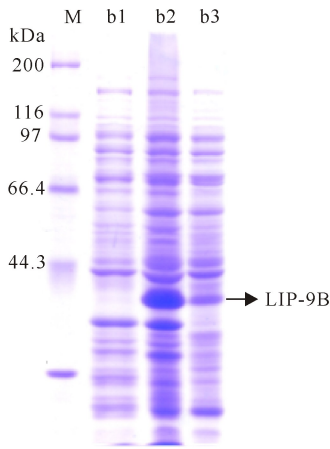
M: Protein marker; a1: pET-22b whole cell lysate; a2: pSE-lipPA-9A whole cell lysate; a3: pSE-lipPA-9A cell lysate's supernatant

图 4 LIP-9A 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of LIP-9A

2.4 脂肪酶分子伴侣基因 lipPA-9B 的克隆表达

以 PA-9 总 DNA 为模板, 扩增 lipPA-9B 并构建重组质粒 pET-lipPA-9B, 再转入 *E. coli* Rosetta (DE3) 进行诱导表达, 并进行 SDS-PAGE 分析(图 5)。结果表明 lipPA-9B 得到大量可溶性表达, 大小为 38 kDa 左右。



M: Protein marker; b1: pET-22b whole cell lysate; b2: pET-*lipPA-9B* whole cell lysate; b3: pET-*lipPA-9B* cell lysate's supernatant

图5 LIP-9B的SDS-PAGE分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of LIP-9B

2.5 脂肪酶包涵体变性及复性研究

含有分子伴侣 LIP-9B 的复性液对 LIP-9A 包涵体蛋白的复性效果较好,不同稀释倍数均能检测到酶活力且以 50 倍稀释倍数最佳,空白对照组均检测不到脂肪酶活力。因此推断本实验所表达的 LIP-9A 需要其特异的分子伴侣蛋白 LIP-9B 的帮助折叠才能形成有活力的脂肪酶。

2.6 共表达重组质粒 pET22b-*lipPA-9A-9B* 的构建及诱导表达

从图 6 中可以看出,*lipPA-9A* 和 *lipPA-9B* 均获得表达,大小分别为 38 kDa 和 32 kDa,与预期大小相符合。在破胞上清液中,有一条很明显的 LIP-9B 蛋白条带,而 LIP-9A 的可溶性表达量少,蛋白条带不明显。通过检测其脂肪酶活力,胞外发酵液对 pNPP 的水解活力为 997 U/L。因为可溶性表达量很少,因此本实验以胞外重组酶 LIP-9A 为研究对象,将发酵液通过超滤浓缩并脱盐得到 LIP-9A 粗酶液进行酶学性质研究。

2.7 重组酶 LIP-9A 的酶学性质

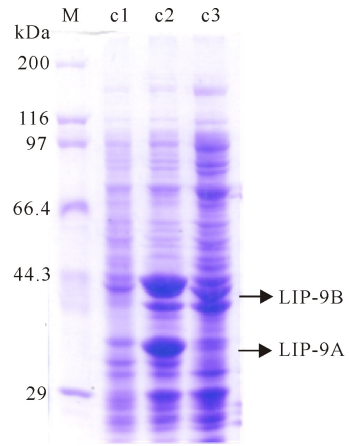
(1)最适反应温度和热稳定性

以 pNPO 为反应底物时,LIP-9A 最适反应温度是 35°C(图 7a)。LIP-9A 在 4~35°C 条件下酶活力较稳定,相对残余酶活力能保持在 80% 以上;而在 35°C 以上酶的残余活力迅速降低,热稳定性较差(图 7b)。

(2)最适反应 pH 值和 pH 稳定性

由图 8a 可知,以 pNPO 为反应底物时,LIP-9A 的最适反应 pH 值是 10.5。LIP-9A 在 pH 值为 6.5~8.0 缓冲液中稳定性较好,保存 24 h 后的残余酶活力仍保持在 80% 以上(图 8b),LIP-9A 最适反应

pH 值以及 pH 稳定性表明该脂肪酶在洗涤工业具有一定的应用价值。



M: Protein marker; c1: pET-22b whole cell lysate; c2: pET22b-*lipPA-9A-9B* whole cell lysate; c3: pET22b-*lipPA-9A-9B* cell lysate's supernatant

图6 LIP-9A和LIP-9B的SDS-PAGE分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of LIP-9A and LIP-9B

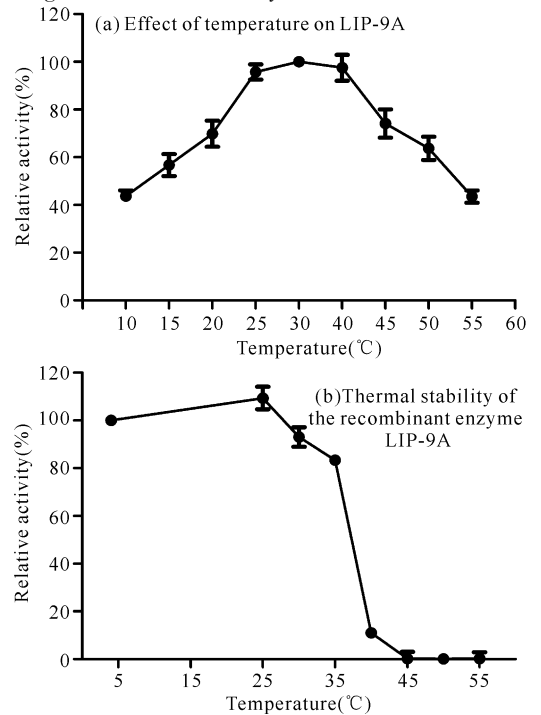


图7 温度对重组酶 LIP-9A 活性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on recombinant enzyme

(3)重组酶 LIP-9A 的底物特异性

由图 9 可知,重组酶 LIP-9A 对对硝基苯酚乙酸酯 pNPA(2C)、对硝基苯酚丁酸酯 pNPB(4C)、对硝基苯酚己酸酯 pNPH(6C)、pNPO(8C)和 pNPP(16C)都有一定的水解作用,且偏好水解长链脂肪酸酯类底物,特别是对 pNPO(8C)具有最高水解活力,说明 LIP-9A 在酯类水解反应中具有一定应用价值。

(4)金属离子对 LIP-9A 活性的影响

由图 10 可知, Mn^{2+} 对酶活力的抑制作用比较强

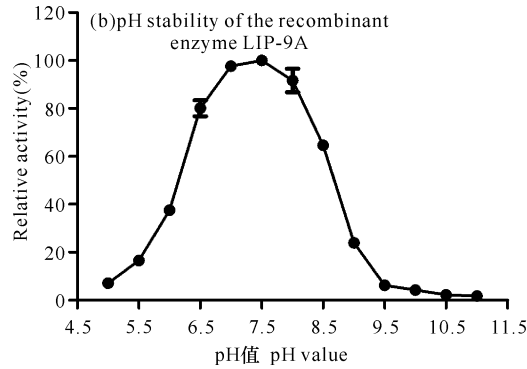
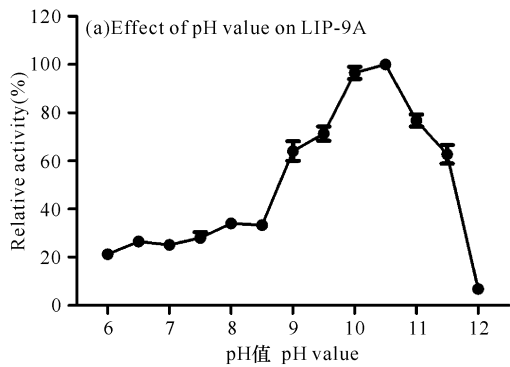


图8 pH值对重组酶LIP-9A活性的影响

Fig. 8 Effect of pH value on recombinant enzyme

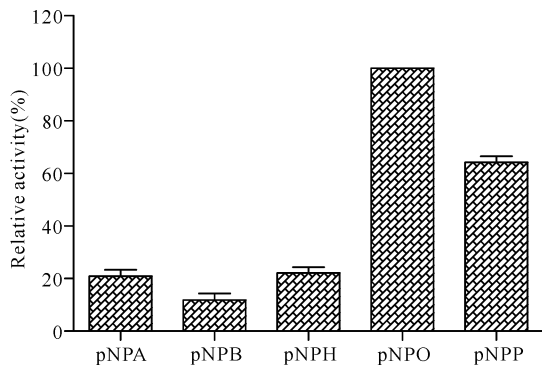


图9 重组酶LIP-9A的底物特异性测定

Fig. 9 Substrate specificity of the recombinant enzyme

LIP-9A

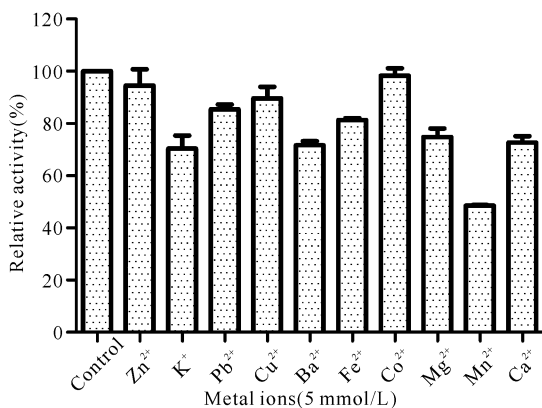


图10 金属离子对重组酶LIP-9A活性的影响

Fig. 10 Effect of metal ions on recombinant enzyme

LIP-9A

烈, K^+ 、 Ba^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 对酶活力有轻微的抑制作用, 而 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Co^{2+} 对 LIP-9A 的活力影响不大。

(5) 化学试剂对 LIP-9A 活性的影响

由表 1 中可以看出, 1%、5% 和 10% (W/V) 的非离子型表面活性剂和离子型表面活性剂均对重组酶 LIP-9A 的具有强烈的抑制作用。

表 1 表面活性剂对重组酶 LIP-9A 活性的影响

Table 1 Effect of detergents on recombinant enzyme LIP-9A

试剂 Detergent	浓度 Concentration(%)	Residue activity(%)	
None	—	100	
Non-ionic detergent	Tween 20	1	0.89±0.81
		5	0.97±0.82
		10	1.79±1.15
	Tween 80	1	2.06±0.55
		5	2.1±2.44
		10	6.54±0.79
Ionic detergent	TritonX-100	1	1.45±1.37
		5	3.72±2.11
		10	2.26±2.22
	SDS	0.1	10.80±1.72
		0.5	1.68±0.64
		1	1.19±2.52
CTAB		0.1	9.59±2.12
		0.5	8.94±5.90
		1	5.73±4.48

由图 11 可知, 1~10 mmol/L 的 EDTA 对重组酶 LIP-9A 均有轻微的抑制作用, 高浓度的 DTT 和 β -巯基乙醇强烈抑制 LIP-9A 的活性。10% (W/V) 的丙酮和 DMSO 对 LIP-9A 的活性没有明显影响, 其他有机试剂对重组酶 LIP-9A 活性均有不同程度的抑制作用。

(6) LIP-9A 的酯化反应

LIP-9A 能够催化醇和酸发生酯化反应, 其中对乙酸和己醇、辛醇的酯化率分别为 5.1% 和 4.2%, 对丁酸和乙醇、丁醇以及己醇的酯化率分别为 59.2%、4.0% 和 5.3%。说明 LIP-9A 所具有酯化性质, 在生物催化领域具有一定的应用价值。

3 结论

大多数细菌脂肪酶都是采用 GSP 分泌途径进行, 通过 N 端信号肽引导到达周质空间, 然后在分子伴侣蛋白的帮助折叠下形成活性蛋白^[11]。本研究所筛选到产碱假单胞菌就是以该方式分泌胞外脂肪酶, 这与之前已报道的通过构建基因文库所获得的 PAL 分泌途径不同^[12]。酶学性质研究表明, LIP-9A 的最适反应温度是 35℃, 在 0~35℃ 稳定性较好; 在弱碱

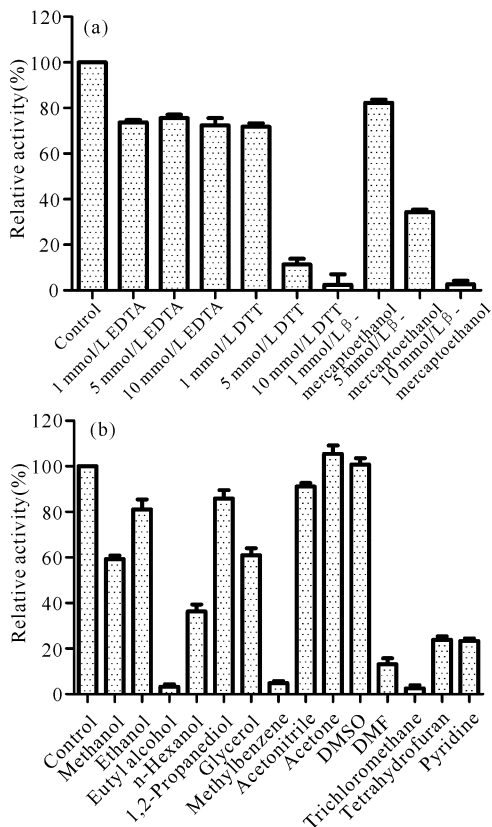


图 11 化学试剂对重组酶 LIP-9A 活性的影响

Fig. 11 Effect of chemicals on recombinant enzyme LIP-9A

性条件下较稳定且具有较高的最适 pH 值 10.5; 偏好水解长链脂肪酸酯类底物, 最适底物是 pNPO (8C); LIP-9A 可催化酸和醇的酯化反应。这些性质表明该碱性脂肪酶 LIP-9A 在生物催化领域中具有潜在的应用价值, 今后的工作主要是实现该酶大量活性表达并通过分子改造技术或者固定化技术提高酶的稳定性和有机溶剂耐受性, 为在洗涤剂和催化合成领域中的应用奠定基础。

参考文献:

[1] VERMA N, THAKUR S, BHATT A. Microbial lipases; Industrial applications and properties (a review) [J]. Int Res J Biol Sci, 2012, 1(8): 88-92.

[2] KAPOOR M, GUPTA M N. Lipase promiscuity and its biochemical applications [J]. Process Biochemistry, 2012, 47(4): 555-569.

[3] AAMAND J L, HOBSON A H, BUCKLEY C M, et al. Chaperone-mediated activation *in vivo* of a *Pseudomonas cepacia* lipase [J]. Molecular & General Genetics MGG, 1994, 245(5): 556-564.

[4] JORGENSEN S, SKOV K W, DIDERICHSEN B. Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterolo-

gous hosts requires two *Pseudomonas* genes [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 559-567.

[5] 唐雪娇, 苗时雨, 吴丰鹏, 等. 产脂肪酶菌落的生物特性研究 [J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2011, 44(5): 23-26.

TANG X J, MIAO S Y, WU F P, et al. Study on biological characteristics of lipase-producing strains [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis, 2011, 44(5): 23-26.

[6] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法 [J]. 生物技术, 2007, 17(1): 39-41.

JIANG S M, ZHANG L, DAI S K, et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from *Actionbacteria* [J]. Biotechnology, 2007, 17(1): 39-41.

[7] ZHENG X, CHU X, ZHANG W, et al. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: Gene cloning and characterisation [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 90(3): 971-980.

[8] 滕昆, 张吉福, 牛福星, 等. 脂肪酶活力测定中终止反应方法的比较分析 [J]. 广西科学, 2014, 21(2): 115-118.

TENG K, ZHANG J F, NIU F X, et al. Comparative analysis of termination reaction methods in lipase activity assay [J]. Gunagxi Sciences, 2014, 21(2): 115-118.

[9] 郑小梅. 不动杆菌脂肪酶与其特异折叠酶的相互作用与功能研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2012.

ZHENG X M. The Interaction and Functional Analysis of the Bacterial Lipase and Its Specific Foldase from *Acinetobacter* sp. [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.

[10] ÖSTLING S, VIRTAMA P. A modified preparation of the universal buffer described by teorell and stenhagen [J]. Acta Physiologica Scandinavica, 1946, 11(4): 289-293.

[11] ROSENAU F, JAEGER K E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion [J]. Biochimie, 2000, 82(11): 1023-1032.

[12] 孙苗苗, 陈辉, 吴坚平, 等. 产碱假单胞菌脂肪酶的克隆表达及酶学性质研究 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(11): 1580-1588.

SUN M M, CHEN H, WU J P, et al. Cloning, expression and characterization of lipase from *Pseudomonas alcaligenes* [J]. Microbiology China, 2012, 39(11): 1580-1588.

(责任编辑: 米慧芝)