

研究报告

来源于青霉 XMZ-9 两个低温脂肪酶的基因克隆、原核表达与性质测定

郑小梅, 伍宁丰, 范云六

中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

郑小梅, 伍宁丰, 范云六. 来源于青霉 XMZ-9 两个低温脂肪酶的基因克隆、原核表达与性质测定. 生物工程学报, 2012, 28(4): 488-497.

Zheng XM, Wu NF, Fan YL. Gene cloning, expression and characterization of two cold-adapted lipases from *Penicillium* sp. XMZ-9. Chin J Biotech, 2012, 28(4): 488-497.

摘要: 低温脂肪酶在低温条件下仍具有较高活性, 在食品添加剂、洗涤添加剂及有机合成等产业具有非常独特的应用前景。从低温菌株中分离低温脂肪酶基因是开发新的低温脂肪酶的有效手段。首先利用油脂同化平板与三丁酸甘油酯-维多利亚蓝平板从冰川土样中筛选分离获得一株具有较高脂肪酶活性的真菌, 18S rDNA 鉴定其属于青霉属, 命名为 *Penicillium* sp. XMZ-9。根据真菌脂肪酶多序列比对获得的保守区, 设计简并引物, 利用降落 PCR 与染色体步移的方法从 *Penicillium* sp. XMZ-9 中克隆到 2 个完整的脂肪酶基因, 分别记为 *LipA* 与 *LipB*。*LipA* 全长 1 014 bp, 无内含子, 编码 337 个氨基酸。而 *LipB* 全长 1 232 bp, cDNA 长 1 122 bp, 含有 2 个内含子, 编码 373 个氨基酸。将两基因的 cDNA 序列克隆到 pET30a (+) 载体上, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)。经低温诱导表达后, *LipA* 大部分表达为包涵体, 包涵体经复性后具有脂肪酶活性, 并表现出低温适应性; *LipB* 则大部分表达为可溶性蛋白, Ni-亲和层析柱纯化后, 其亦具有低温脂肪酶活性。青霉菌株 XMZ-9 的获得与低温脂肪酶的克隆表达研究, 为研究低温菌株与低温酶的适冷机制提供了宝贵的资源, 也为进一步开发利用低温脂肪酶奠定了基础。

关键词: 青霉菌, 脂肪酶, 基因克隆, 包涵体, 体外复性

Received: October 21, 2012; **Accepted:** January 12, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30900839).

Corresponding author: Ningfeng Wu. Tel/Fax: +86-10-82109844; E-mail: wunf@caas.net.cn

国家自然科学基金 (No. 30900839) 资助。

Gene cloning, expression and characterization of two cold-adapted lipases from *Penicillium* sp. XMZ-9

Xiaomei Zheng, Ningfeng Wu, and Yunliu Fan

Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: Cold-adapted lipases are attractive biocatalysts that can be used at low temperatures as additives in food products, laundry detergents, and the organic synthesis of chiral intermediates. Cold-adapted lipases are normally found in microorganisms that survive at low temperatures. A fungi strain XMZ-9 exhibiting lipolytic activity was isolated from the soil of glaciers in Xinjiang by the screening plates using 1% tributyrin as the substrate and Victoria blue as an indicator. Based on morphological characteristics and phylogenetic comparisons of its 18S rDNA, the strain was identified as *Penicillium* sp. The partial nucleotide sequences of these two lipase related genes, *LipA* and *LipB*, were obtained by touchdown PCR using the degenerate primers designed according to the conservative domains of lipase. The full-length sequences of two genes were obtained by genome walking. The gene *lipA* contained 1 014 nucleotides, without any intron, comprising one open reading frame encoding a polypeptide of 337 amino acids. The gene *lipB* comprised two introns (61 bp and 49 bp) and a coding region sequence of 1 122 bp encoding a polypeptide of 373 amino acids. cDNA sequences of both *lipA* and *lipB* were cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant LipA was mostly expressed as inclusion bodies, and recovered lipase activity at low temperature after *in vitro* refolded by dilution. Differently, the recombinant LipB was expressed in the soluble form and then purified by Ni-NTA affinity chromatography Column. It showed high lipase activity at low temperature. These results indicated that they were cold-adapted enzymes. This study paves the way for the further research of these cold-adapted lipases for application in the industry.

Keywords: *Penicillium*, lipase, gene cloning, inclusion body, *in vitro* refolding

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 是一类重要的工业用酶, 广泛存在于动物、植物和微生物中^[1]。与动、植物脂肪酶相比, 微生物脂肪酶具有底物广谱性, 并且具有更广的 pH 与温度作用范围, 更适合于工业化大生产和获得高纯度样品, 从而使微生物脂肪酶成为工业用脂肪酶的重要来源^[2]。

低温脂肪酶在低温下仍具有较高活性, 使其成为近年来研究的热点^[3]。这类酶进化出了更高的结构柔韧性, 尤其是在活性位点附近, 往往使其具有较低的活化能, 从而酶在低温环境下更容易发挥催化作用, 提高对底物的利用率^[4]。此外, 低温脂肪酶的结构柔韧性使其在高温条件下的热稳定性相对于中温酶要差一些^[3]。但正是这些

特点使低温脂肪酶在食品添加剂、洗涤添加剂及有机合成等产业中具有非常独特的应用前景^[5-7]。在食品行业, 可作为低温添加剂改善食品的风味; 在洗涤行业, 可在冷水中仍具有较好的去油污的效果等等^[8-10]。低温脂肪酶往往存在于那些常年生活在如冰川、深海、南极甚至冰箱等低温环境中的低温微生物中^[10-14]。目前, 低温脂肪酶多来源于细菌与酵母, 来源于真菌的还非常少见^[3]。

本研究从冰川土样中分离获得一株具有较高脂肪酶酶活的青霉菌 *Penicillium* sp. XMZ-9。利用 TAIL-PCR 等方法从 *Penicillium* sp. XMZ-9 基因组中克隆到 2 个完整的脂肪酶相关基因:

LipA 与 *LipB*; 并将两基因的 cDNA 序列在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 中得到了高效表达。经体外复性或亲和纯化等方法纯化后, 对 2 个重组酶进行温度适应性测定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种与质粒

青霉菌 *Penicillium* sp. XMZ-9 由本实验室从冰川土壤中分离并鉴定; *E. coli* Top10、*E. coli* BL21 (DE3) 与表达质粒 pET30a (+) 均由本实验室保存; 克隆质粒 pEASY-T3 载体购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、染色体步移试剂盒均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒与 RNA prep pure 植物 (真菌) 总 RNA 提取试剂盒购自天根生物技术公司; 蛋白定量试剂盒购自 Bio-Rad 公司; Ni-NTA 树脂购自 QIAGEN 公司; 丙烯酰胺、N,N'-亚甲叉丙烯酰胺、IPTG 购自 Sigma 公司; 酵母提取物、蛋白胨购自 Oxford 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 产脂肪酶菌株的筛选

我们从新疆冰川低温土样中进行了低温微生物的富集培养与分离鉴定。用富集培养基 (1% (V/V) 橄榄油, 0.5% (W/V) 蛋白胨与 0.5% (W/V) NaCl) 对土样在 25 °C 下低温富集培养后, 将过夜培养物稀释后涂布于含有 1% (V/V) 橄榄油的琼脂平板中。将划线后的单菌落在含有 1% (V/V) 三丁酸甘油酯与维多利亚蓝的脂肪酶

筛选平板上进行产脂肪酶活性的定性检测。根据降解透明圈的大小, 我们选取了产脂肪酶真菌 XMZ-9 进行后续研究。通过菌落形态与 18S rDNA 的分子鉴定来鉴定真菌 XMZ-9 的种属分类。

1.2.2 青霉菌基因组 DNA 与 RNA 的提取

青霉菌基因组 DNA 的提取按照文献[15]进行; 其总 RNA 的提取则按照 RNA prep pure 植物 (真菌) 总 RNA 提取试剂盒说明书操作。

1.2.3 青霉菌脂肪酶基因及 cDNA 序列的克隆

从 GenBank 数据库中下载不同真菌脂肪酶的蛋白序列, 使用 ClustalW 软件^[16]进行多序列比对分析确定真菌脂肪酶的保守区 (FHGGG 与 GFSAGG)。依据所得的保守区与青霉菌密码子的偏爱性设计简并引物 lipPF 与 lipPR (表 1)。以 *Penicillium* sp. XMZ-9 基因组 DNA 为模板, 利用简并引物进行降落 PCR, 扩增两保守区之间的基因序列。降落 PCR 的条件为: 首先 94 °C 预变性 5 min; 然后 20 个降落循环: 94 °C 变性 30 s, 退火温度从 65 °C 开始, 此后每个循环降落 0.5 °C, 至 55 °C, 72 °C 延伸 30 s; 再次 20 个循环: 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物回收后连接到 pEASY-T3 载体进行序列测定与分析。

为获得完整的基因全长, 以已知序列为模板向上下游方向分别设计 3 个嵌套的特异引物 (表 1), 然后用染色体步移试剂盒进行染色体步移。针对 *LipA* 基因的上游序列克隆所用引物为 lipAFsp1、lipAFsp2、lipAFsp3; 针对 *LipA* 基因的上游序列克隆所用引物为 lipARsp1、lipARsp2、lipARsp3; 针对 *LipB* 基因的上游序列克隆所用引物为 lipBFsp1、lipBFsp2、lipBFsp3; 针对 *LipB* 基因的上游序列克隆所用引物为 lipBRsp1、

lipBRsp2、lipBRsp3。将所得的各个基因的上下游片段与已知序列用 Vector NTI Suite 9.0 (InforMax, Gaithersburg, MD, USA) 软件进行拼接。全基因序列在 NCBI 网站利用 BLAST X (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行相似性比对研究。用 DS Gene 软件预测完整的开放阅读框, 并利用 Gene Finder 软件 (<http://www.bioscience.org/urlists/genefind.html>) 分析基因中的外显子与内含子。

表 1 基因克隆与表达所用引物

Table 1 Primers used for gene cloning and expression in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
lipPF	GTGGTGTAYTTYCAYGGBGG
lipPR	CAGGTTGCCRCCSGCRCTRCTC
lipAFsp1	CACACTTGGTGCCGCTAC
lipAFsp2	AAACCGGTGCTCGACACT
lipAFsp3	GGCTGTAATGGTGAGCGT
lipARsp1	ACGCTCACCATTACAGCC
lipARsp2	GTGTCGAGCACCGGTTTC
lipARsp3	GTAGCGGCACCAAGTGTG
lipBFsp1	GGTGGGTGTTTGGTGGACTA
lipBFsp2	TTTCTGCAAGCGAGTTGTCC
lipBFsp3	GGACCTTGTCGATTTGATG
lipBRsp1	CATCAAATGCGACAAGGTCC
lipBRsp2	CATGGACAACCTCGCTTGCAG
lipBRsp3	GGCTAGTCCACCAAACACCC
lipAFm	gaattcATGGCCTCGTCTCGTTGG T
lipARm	gcggccgcAATAATACATGGAAAGT
lipBFm	gagctcATGGCCTCTCAAACCTGTAG
lipBRm	ctcgagCTTGAACCTGAACCTTATC
Olig (dT)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Note: Y represents C or T; B represents C, G or T; R represents A or G; S represents C or G. Restriction sites are denoted in lowercase.

以 5 μ g 总 RNA 为模板, 用反转录酶 Rever Tra Ace 和引物 Oligo-dT 进行反转录反应, 获得 cDNA 的第一链。以 lipAFm (含 *EcoR* I 酶切位点) 与 lipARm (含 *Not* I 酶切位点) 及 lipBFm (含 *Sac* I 酶切位点) 与 lipBRm (含 *Xho* I 酶切位点) 为引物进行 PCR, 扩增两基因带酶切位点修饰的全长 cDNA。PCR 产物回收后连接到 pEASY-T3 载体进行序列测定与分析。

1.2.4 重组表达载体的构建与诱导表达

用相应的限制酶酶切测序正确的 pEASY-T3 重组质粒, 将目的基因的酶切片段与同样酶切处理的表达质粒 pET30a (+) 进行连接。将验证正确的重组表达质粒 pET-*lipA*、pET-*lipB* 及空表达质粒 pET30a (+) 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3)。将转化菌株过夜活化后, 以 1% 的接种量转接至 50 mL 含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 振荡培养约 2 h, 当 OD_{600} 达到 0.6 后, 加入 20 μ L 1 mol/L IPTG 在 16 $^{\circ}$ C 下进行低温过夜诱导表达。将 50 mL 菌液高速离心弃上清, 菌体用 5 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液重悬, 加入 PMSF (终浓度为 0.1 mmol/L), 进行超声波破碎细胞, 15 000 r/min 离心 20 min, 破碎后的上清液为破碎上清即可溶性的重组酶液, 沉淀为包涵体的粗提物。分别加入等体积 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 进行浓度为 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 重组蛋白的亲纯化

首先用 10 mL 平衡缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% 甘油与 0.5 mol/L NaCl) 平衡亲和层析树脂 Ni-NTA 柱, 然后加入破碎上清的样品, 再分别加入 10 mL 含有 0、20、100、200 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱并收集

相应洗脱液。取 50 μL 穿透峰及各洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测。收集纯度较好的洗脱液在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中进行过夜透析, 除去洗脱液中的咪唑。

1.2.6 包涵体蛋白的变性与复性

用 1 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液洗涤包涵体的粗提物 2 次, 然后分别用 1 mL 2 mol/L 与 4 mol/L 尿素洗涤沉淀, 除掉可能的杂蛋白, 最后将沉淀重溶于 500 μL 8 mol/L 尿素变性液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育使沉淀充分溶解。变性后的蛋白用复性缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 10% 甘油与 1% 甘氨酸) 进行不同倍数稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h, 进行稀释复性并摸索合适的稀释倍数。

1.2.7 重组脂肪酶的活性测定

脂肪酶活性检测采用分光光度计比色法检测对硝基酚的生成量^[17]。底物母液为 500 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基辛酸酯的乙醇溶液。标准的反应条件为 100 μL 的底物母液溶于 1.8 mL 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 中, 35 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min 后再加入 100 μL 检测酶液, 准确反应 10 min, 然后加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸溶液终止反应, 再加入 0.5 mL 10% 碳酸钠溶液显色。高速离心去除沉淀后, 410 nm 下测定脂肪酶催化产生的对硝基酚的光吸收值。一个脂肪酶酶活单位 (1 U) 定义为在 pH 8.0, 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 每分钟释放 1 $\mu\text{mol/L}$ 对硝基酚所需的酶量。对照反应为在相同条件下加入等量已灭活的酶液。每个反应均做 3 个平行样, 取平均值作为最终酶活值。

1.2.8 脂肪酶温度适应性的测定

在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液和不同温度 (0~60 $^{\circ}\text{C}$) 下测定脂肪酶活性, 根据相对

酶活值来确定最适温度。将酶液先在 40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 与 60 $^{\circ}\text{C}$ 下处理不同的时间梯度 2、5、10、20、40、60、80、100 min, 再测定残留酶活值以检测酶蛋白的温度稳定性。

2 结果

2.1 产脂肪酶菌株的筛选

通过富集培养从新疆冰川低温土样中分离到 5 株低温真菌。根据降解透明圈的大小, 选取了产脂肪酶活性最高的真菌 XMZ-9 进行后续研究。菌落形态与 18S rDNA 的分子鉴定表明 XMZ-9 为青霉属 *Penicillium*。其 18S rDNA 在 GenBank 数据库的登录号为 FJ973461。

2.2 青霉菌脂肪酶基因及 cDNA 序列的克隆与分析

以 *Penicillium* sp. XMZ-9 基因组 DNA 为模板, 利用简并引物 (lipPF 与 lipPR) 降落 PCR, 扩增到一个大小约为 220 bp 的片段。PCR 产物经序列测定与比对分析发现其包括 2 段相似性为 60% 且大小相差 6 bp 的基因片段。用 BLAST X 进行序列比对表明其中一个基因片段与来源于棒曲霉 *Aspergillus clavatus* NRRL 1 的脂肪酶相似性为 79%; 另一基因片段与来源于费氏新萨托 *Neosartorya fischeri* NRRL 181 的酯酶相似性为 86%。

根据已获得的两段基因片段设计了向上、下游方向的特异引物 (表 1), 利用染色体步移试剂盒扩增获得了两基因片段的侧翼序列 (图 1)。经基因拼接与序列分析表明已获得 2 个编码脂肪酶的完整基因, 分别记为 *LipA* 与 *LipB* (GenBank 数据库的登录号分别为 FJ973462 与 FJ973463)。随后, 利用 RT-PCR 从 *Penicillium* sp. XMZ-9 总

RNA 中扩增到 2 个基因的全长 cDNA 序列。

脂肪酶结构基因 *LipA* 全长 1 014 bp, 无内含子, 编码 337 个氨基酸和 1 个终止密码子, 成熟蛋白理论分子量 38.39 kDa。蛋白序列比对结果表明与黑曲霉 *Aspergillus niger* strain CBS 513.8 脂肪酶 LipP (GenBank Accession No. A2Q8U6) 的一致性最高为 68%。用 SignalP 3.0 Server 信号肽预测表明其 1~22 aa 为信号肽。而脂肪酶结构基因 *LipB* 全长 1 232 bp, cDNA 长 1 122 bp, 含有 2 个内含子, 分别为位于 +538~+598 (61 bp) 的内含子序列与位于 +917~+966 (49 bp) 的内含子序列。该基因编码 373 个氨基酸和 1 个终止密码子, 成熟蛋白理论分子量 41.63 kDa。蛋白序列比对结果表明与 *N. fischeri* NRRL 181 的酯酶 (GenBank Accession No. A1DL68) 的一致性最高为 75%。用 SignalP 3.0 Server 信号肽预测表明其无信号肽。

2.3 青霉菌脂肪酶的诱导表达

以 cDNA 为模板, 以 lipAFm 与 lipARm 为引物进行 PCR 扩增到目的基因 *LipA*; 以 lipBFm 与 lipBRm 为引物进行 PCR 扩增到目的基因 *LipB*。测序无误后, 分别克隆至表达载体 pET30a (+), 构建表达重组质粒 pET-*lipA* 与 pET-*lipB*。在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的诱导表达发现, 经 IPTG 诱导后, 基因 *lipA* 基本表达为不可溶的包涵体 (40 kDa, 图 2, Lane 2); 而基因 *lipB* 则大部分表达为可溶的蛋白形式 (43 kDa, 图 2, Lane 5)。

2.4 活性重组酶 LipA 与 LipB 的获得

由于重组酶 LipA 大部分表达为不可溶的包涵体, 因此采用了尿素变性与稀释复性的方法来获得其活性脂肪酶。经 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、2 mol/L 与 4 mol/L 尿素洗涤沉淀去除杂蛋白后, 用 8 mol/L 尿素可将包涵体完全变性。

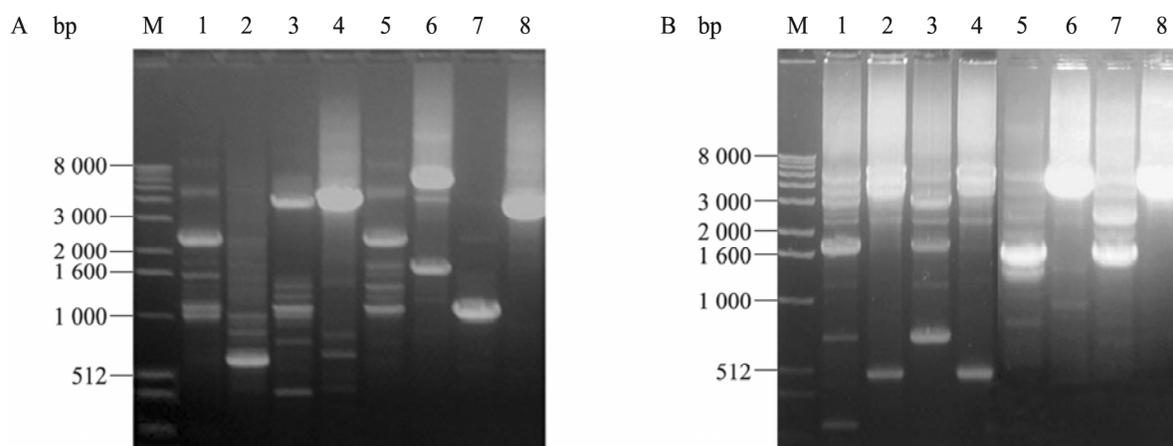


图 1 青霉菌脂肪酶染色体步移电泳图

Fig. 1 Genome walking results of *Penicillium* lipases. (A) genome walking results of *LipA*. (B) genome walking results of *LipB*. M: 1 kb standard protein molecular weight markers; 1,3,5,7: the 2nd PCR results in genome walking processes; 2,4,6,8: the 3rd PCR results in genome walking processes; 1,2,5,6: the PCR results using No.2 AD primer; 3,4,7,8: the PCR results using No.4 AD primer.

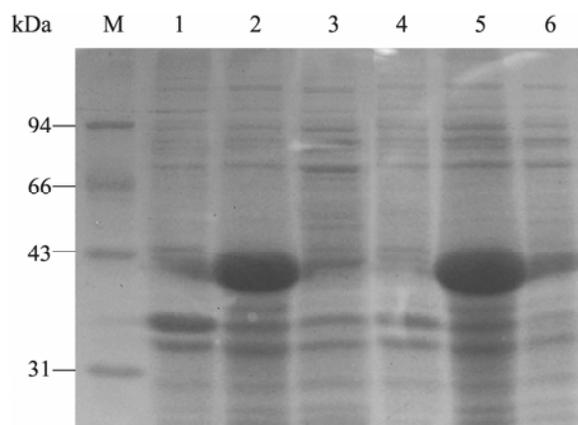


图 2 SDS-PAGE 电泳检测重组青霉菌脂肪酶 LipA 与 LipB 在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of recombinant LipA and LipB expressed in *E. coli*. M: standard protein molecular weight markers; 1,2: lysate supernatant (1) and cell pellet (2) of transformed bacteria harboring pET-*lipA*; 3,4: lysate supernatant (3) and cell pellet (4) of transformed bacteria harbouring empty vector pET30a(+); 5,6: lysate supernatant (5) and cell pellet (6) of transformed bacteria harboring pET-*lipB*.

变性后的样品可达到电泳纯的纯度, 如图 3A 所示。通过不同的稀释倍数进行稀释复性发现稀释 50 倍时, 其酶活可达到 15.72 U/mL。

相对而言, 重组酶 LipB 大部分表达为可溶的形式, 利用 Qiagen 的 His-标签蛋白亲和层析柱进行了纯化, 含有 100 mmol/L 与 200 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱效果较好, 透析浓缩后, 可达到电泳纯, 如图 3B 所示; 纯化的 LipB 酶活可达到 7.34 U/mL。

2.5 重组脂肪酶酶 LipA 与 LipB 的温度适应性

重组酶 LipA 与 LipB 最适温度的酶活性测定结果表明, 两者水解对硝基辛酸酯的最适反应温度分别为 30 °C 与 40 °C (图 4)。LipA 在温度低于 30 °C 时, 随着温度升高酶的活性逐步上升, 在 10 °C 与 20 °C 时相对酶活性达到 28.18% 与 60.11%; 高于 30 °C 酶活力下降, 到 60 °C 只有

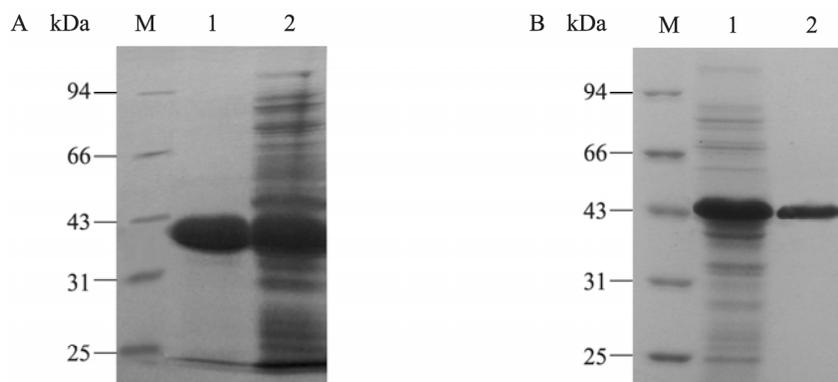


图 3 纯化的重组青霉菌脂肪酶 LipA 与 LipB SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant LipA and LipB. (A) the recombinant LipA protein, expressed in *E. coli* and dissolved in 8 mol/L urea, was analyzed by SDS-PAGE. M: standard protein molecular-weight markers; 1: purified inclusion body containing LipA; 2: cell pellet of transformed bacteria harboring pET-*lipA*. (B) the recombinant LipB protein, recovered at various points in the purification process, was analyzed by SDS-PAGE. M: standard protein molecular weight markers; 1: lysate supernatant of transformed bacteria harboring pET-*lipB*; 2: purified LipB after dialysis and concentration.

最大活力的 37.23%；在 20 °C 到 50 °C 的条件下仍具有 50% 以上的酶活。LipB 在温度低于 40 °C 时，随着温度升高酶的活性逐步上升，在 10 °C 与 20 °C 时相对酶活性可分别达到 31.27% 与 56.99%；高于 40 °C 酶活力迅速下降，到 60 °C 时只有最大活力的 18.91%；在 20 °C 到 50 °C 的条件也保持有 50% 以上的酶活。

热稳定性实验中，酶活性测定结果表明，重组酶 LipA 与 LipB 的热稳定性都不是很好，但相对而言，LipA 的热稳定性略好于 LipB (图 5)。在低温条件 40 °C 下，LipA 与 LipB 保温 100 min 后相对酶活仍具有 85.26% 与 79.03%。但随温度的提高，脂肪酶的活性下降较为明显。在 50 °C 下，LipA 与 LipB 保温 100 min 后相对酶活分别只具有 30.85% 与 23.57%。在 60 °C 下，LipA 与 LipB 保温 10 min 后相对酶活明显下降至 23.32% 与 31.55%。保温 100 min 后相对酶活分别只具有 11.66% 与 6.09%。

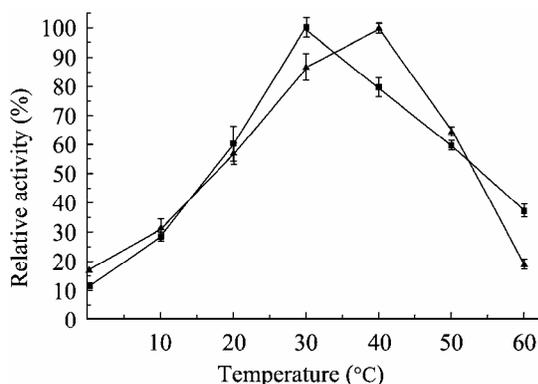


图 4 重组脂肪酶 LipA 与 LipB 酶反应最适温度
Fig. 4 Influence of temperature on lipase activity. Activity of LipA (filled square) and LipB (filled triangle) was assayed at pH 8.0 and a range of different temperatures using *p*-NP decanoate as substrate.

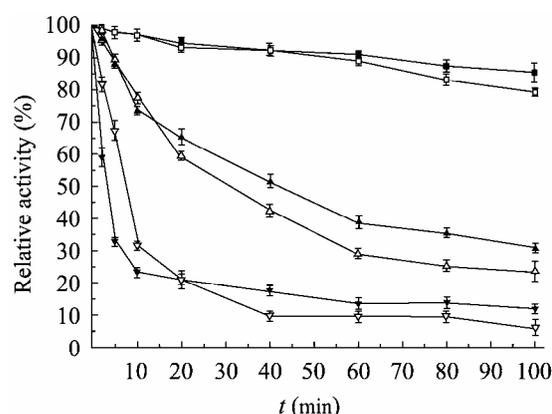


图 5 重组脂肪酶 LipA 与 LipB 酶反应热稳定性
Fig. 5 Thermostability of purified LipA (filled) and LipB (empty). The recombinant LipA and LipB were incubated in 50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 40 °C (square), 50 °C (triangle), and 60 °C (downward-pointing triangle) for the indicated periods of time, and enzymatic activity was measured using *p*-NP decanoate as substrate.

3 讨论

低温微生物主要分布于冰川、高山及南极等终年保持低温的环境中。产脂肪酶低温微生物多为细菌与酵母，产脂肪酶低温真菌中还非常少见^[2]。早在 1961 年，Alford 与 Pierce^[18]就从冷冻的食物样品中分离到一些嗜冷真菌如解脂假丝酵母 *Candida lipolytica*、白地霉 *Geotrichum candidum* 与萎地青霉 *Penicillium roqueforti* 能产生低温脂肪酶，但未进行深入的研究。Mayordomo 等^[19]从构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* WG312 中纯化了一低温脂肪酶，其最适温度为 40 °C，但其产量有限，限制了其应用，此外并未进行基因克隆与表达研究。本文从冰川土样中分离得到菌株 *Penicillium* sp. XMZ-9。利用低温微生物可特异性地表达分泌低温酶的特性^[20]，在 25 °C 下富集培养，并通过三丁酸甘油酯与维多利亚蓝的筛

选平板上的降解圈筛选出了具有较高脂肪水解活性的 *Penicillium* sp. XMZ-9。

从自然界中筛选得到的脂肪酶产生菌中, 脂肪酶基因受到较为严谨的调控, 因此脂肪酶的生产量较少, 即使通过诱变发酵后也难以满足市场的需求^[21]。利用基因工程技术, 从脂肪酶产生菌中克隆脂肪酶基因并进行异源或同源重组表达是有效的解决办法^[21]。本文中通过对已有真菌脂肪酶的多序列比对, 发现了 2 个真菌源脂肪酶的保守区: 氧阴离子洞 FHGGG 与催化活性位点 G(F/S)S(A/V)GG。设计简并引物, 利用降落 PCR, 直接从基因组中克隆到了 2 个相似性较低的脂肪酶基因片段。随后通过染色体步移的方法成功克隆了 2 个脂肪酶基因。由此可见, 采用这一策略是行之有效的获得完整未知基因方法^[22]。

真菌脂肪酶基因中内含子的数目各不相同, 对于有内含子的脂肪酶基因的内含子的结构和剪接位置与已确定的丝状真菌都非常类似^[15], 例如长度一般小于 100 bp, 5'-剪接位点为 GTRNGT, 3'-剪接位点为 YAG (R: 嘌呤碱核苷酸, Y: 嘧啶碱核苷酸, N: 任意核苷酸)。 *Penicillium* sp. XMZ-9 的基因 *lipA* 没有内含子, 但 *lipB* 中存在 2 个内含子, 分别为 61 bp 与 49 bp 的内含子序列, 在其末端都具有内含子典型的剪接位点序列 5'-GTGAGT-3' 与 5'-TAG-3'。

pET 表达系统是应用最为广泛的大肠杆菌表达系统, 但其表达产物往往形成无活性的包涵体, 如来源于黑曲霉 *A. niger* F044 的脂肪酶 AnI^[23]。本文中来源于 *Penicillium* sp. XMZ-9 的 2 个脂肪酶在 pET 表达系统中, 一个表达为包涵体, 一个则正常表达为可溶的蛋白, 可推断是否表达为包涵体可能更取决于目的基因本身。

低温脂肪酶是指最适催化反应温度在 30 °C 左右, 在低温下仍具有一定活性的脂肪酶^[20]。经最适温度与温度稳定性测定, 发现重组脂肪酶 LipA 与 LipB 的反应最适温度在 30°C~40 °C 之间, 在 20 °C 时相对酶活均超过 50%, 并且在高温下温度稳定性不好, 这都与低温脂肪酶的基本特征相一致。可初步判定得到的 2 个基因为低温脂肪酶基因, 这也是与菌株的原始生长环境相一致。

低温脂肪酶以其独特性质具有广阔的应用前景。本文从同一青霉菌中克隆获得 2 个相似性较低的脂肪酶基因, 并在大肠杆菌中进行了异源表达与纯化。温度适应性测定表明 2 个重组酶为低温脂肪酶。本实验室也继续探索采用酵母或黑曲霉表达系统来进行分泌表达, 期望获得更好的低温脂肪酶表达工程菌, 为下一步的开发应用奠定基础。

REFERENCES

- [1] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*, 1999, 53(1): 315-351.
- [2] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, 118(1/3): 155-170.
- [3] Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv*, 2008, 26(5): 457-470.
- [4] D'Amico S, Claverie P, Collins T, et al. Molecular basis of cold adaptation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2002, 357(1423): 917-925.
- [5] Kato M, Fuchimoto J, Tanino T, et al. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular

- display system and its practical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 75(3): 549–555.
- [6] Joseph B. Isolation, purification and characterization of cold adapted extracellular lipases from psychrotrophic bacteria: feasibility as laundry detergent additive[D]. Allahabad: Allahabad Agricultural Institute-Deemed University, 2006.
- [7] Ghanem A, Aboul-Enein MN, El-Azzouny A, et al. Lipase-mediated enantioselective kinetic resolution of racemic acidic drugs in non-standard organic solvents: direct chiral liquid chromatography monitoring and accurate determination of the enantiomeric excesses. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(7): 1063–1074.
- [8] Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, et al. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 486–491.
- [9] Park IH, Kim SH, Lee YS, et al. Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, 19(2): 128–135.
- [10] Suzuki T, Nakayama T, Kurihara T, et al. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain No. 6. *J Biosci Bioeng*, 2001, 92(2): 144–148.
- [11] Lee HK, Ahn MJ, Kwak SH, et al. Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp. LPB 4. *J Microbiol*, 2003, 41(1): 22–27.
- [12] Ryu HS, Kim HK, Choi WC, et al. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70(3): 321–326.
- [13] Arpigny JL, Lamotte J, Gerday C. Molecular adaptation to cold of an Antarctic bacterial lipase. *J Mol Catal B Enzym*, 1997, 3(1/4): 29–35.
- [14] Joseph B, Ramteke PW, Kumar PA. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. *J Gen Appl Microbiol*, 2006, 52(6): 315–320.
- [15] Lin L, Xie BF, Yang GZ, et al. Cloning and Sequencing of Genomic DNA Encoding Alkaline Lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, 19(1): 12–16.
林琳, 谢必峰, 杨冠珍, 等. 扩展青霉 PF898 碱性脂肪酶基因组 DNA 的克隆及序列分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2003, 19(1): 12–16.
- [16] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [17] Zheng XM, Chu XY, Zhang W, et al. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterisation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(3): 971–980.
- [18] Alford JA, Pierce DA. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. *J Food Sci*, 1961, 26(5): 518–524.
- [19] Mayordomo I, Randez-Gil F, Prieto JA. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(1): 105–109.
- [20] Tang B, Tang XF, Peng ZR. Advance in psychrophiles study. *J Microbiol*, 2002, 22(1): 51–53.
唐兵, 唐晓峰, 彭珍荣. 嗜冷菌研究进展. *微生物学杂志*, 2002, 22(1): 51–53.
- [21] Wang HY, Li FW, Gao XH. Advance in lipase and its application in feed. *Feed Ind*, 2007, 28(6): 14–17.
王海燕, 李富伟, 高秀华. 脂肪酶的研究进展及其在饲料中的应用. *饲料工业*, 2007, 28(6): 14–17.
- [22] Bell PJ, Sunna A, Gibbs MD, et al. Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 8): 2283–2291.
- [23] Shu ZY, Yang JK, Xu L, et al. *Aspergillus niger* F044 lipase: gene cloning, overexpression and in vitro refolding. *Microbiol China*, 2007, 34(3): 443–446.
舒正玉, 杨江科, 徐莉, 等. 黑曲霉脂肪酶: 基因克隆、表达及体外复性. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 443–446.