

海鲍分离微生物 *Acinetobacter* sp. 酯酶基因的表达和酶学性质

张秋芳¹ 李仁宽^{1,2} 林娟^{1,2} 叶秀云^{1,2*}

(1. 福州大学 生物科学与工程学院 福建 福州 350108)

(2. 酶高效表达国家工程实验室 福建 福州 350002)

摘要:【目的】克隆源于海鲍内脏中一株不动杆菌 *Acinetobacter* sp. 的酯酶基因 *estA*, 并对其重组表达和性质研究。【方法】利用分子生物学技术克隆出酯酶基因 *estA* 并构建 pPICZ α -C-*estA* 重组表达载体, 并通过电转化方法将重组质粒转入毕赤酵母 X33 中; 通过甲醇诱导培养重组菌获得重组酯酶, 并对重组酯酶进行生化表征。【结果】克隆得到的 *estA* 基因序列全长 912 bp, 编码 304 个氨基酸; 重组 X33 发酵上清液中酯酶活力达到 1 200 U/L, 重组酯酶的分子量约为 33.7 kD; 酶学性质研究表明重组酯酶催化底物对硝基苯乙酸乙酯水解反应的最适 pH 和温度为 8.0 和 40 °C, 在 pH 8.0–10.0 温度及小于 60 °C 时具有较好的稳定性。【结论】成功克隆了海洋来源的不动杆菌酯酶基因并在 *Pichia pastoris* 中实现了高效表达。

关键词: 不动杆菌, 酯酶, 毕赤酵母, 克隆表达

Expression and characterization of an alkaline esterase from marine *Acinetobacter* sp.

ZHANG Qiu-Fang¹ LI Ren-Kuan^{1,2} LIN Juan^{1,2} YE Xiu-Yun^{1,2*}

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. National Engineering Laboratory for Highly Efficient Enzyme Expression, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: [Objective] The gene encoding *estA* in a strain of *Acinetobacter* sp. screened from abalone visceral was cloned and expressed in *Pichia pastoris*. [Methods] The *estA* gene was amplified and integrated into the genome of *P. pastoris* X33 via the pPICZ α -C vector. The recombinant *estA* was expressed into the culture medium, and the recombinant protein were purified and characterized. [Results] The *estA* gene of 912 bp was cloned. After induced with methanol, recombinant esterase reached 1 200 U/L with weight of 33.7 kD. The optimum pH and temperature of recombinant esterase were 8.0 and 40 °C, respectively. Furthermore, this esterase exhibited remarkable stability at pH between 8.0–10.0 and under 60 °C. [Conclusion] The gene of *estA* from *Acinetobacter* sp. was successfully cloned and expressed in *P. pastoris*.

Keywords: *Acinetobacter*, Esterase, *Pichia pastoris*, Clone and expression

基金项目: 海洋公益性行业科研专项项目(No. 201305015); 国家 863 计划项目(No. 2013AA102101); 福建省教育厅项目(No. JA13032); 福建省自然科学基金项目(No. 2011J01218)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-591-22866376; ✉: xiuyunye@fzu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-27; 接受日期: 2014-02-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-18

酯酶(Esterase, EC 3.1.1.1)是具有催化水解酯的一类水解酶的总称,可用于酯化、转酯、酯交换等反应,广泛存在于动物、植物和微生物体内^[1-2]。目前,由于微生物资源丰富且利于大规模发酵生产,微生物酯酶是酯酶的主要来源之一。酯酶属于丝氨酸水解酶家族的成员,作为生物催化剂可催化不同类型底物的水解和合成反应。酯酶能够水解或合成酰基碳链长度小于10的甘油酯类,对于酰基碳链长度大于10的甘油酯类则没有催化活性^[3]。同时,酯酶催化的反应还具有反应条件温和、反应介质的选择性大、产物易分离纯化且酶本身易于回收等优点^[4]。目前,微生物酯酶已得到广泛关注,并且主要应用于食品、农业、医药、污水处理等领域。

海洋占地球表面积71%,是地球上最大的生态系统,微生物资源丰富。海洋具有耐盐、耐压、耐低温等特性,在极端环境中生存的微生物在生物材料和生物催化剂中具有新的丰富的潜在功能,使得海洋微生物所产的酶与陆源性微生物所产的酶相比,具有更为独特的酶学性质和应用前景^[5]。产酯酶微生物在自然界中分布十分广泛,国外在这个领域的相关研究报道较多,但国内并不多见。在已报道的可产生酯酶的微生物中,野生型菌株的产酶能力较低,同时此类酯酶又因其温度和pH稳定性局限而不适用于工业化生产。因此,从海洋微生物中筛选出独具特性的酯酶就成为开发新型工业酶制剂首要解决的问题^[6-7]。

不动杆菌为革兰氏阴性球杆菌,产生的酯酶具有对酯类的转酯性、水解性、对应选择性和对溶剂的耐受性等特点。野生型的不动杆菌能生产酯酶,但产酶量较低,为了提高*estA*的表达量,本文采用毕赤酵母表达系统,将去掉自身信号肽的*estA*基因克隆至甲醇诱导型表达载体pPICZ α -C中,并电转化到毕赤酵母X33中获得高效表达酯酶的基因工程菌。此外,对该重组菌所产的酯酶进行分离纯化及酶学性质研究。

1 材料

1.1 菌株和质粒

不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)为本实验室从海洋鲍鱼内脏中分离的菌株;大肠杆菌(*Escherichia coli*) TOP10,毕赤酵母X33,pPICZ α -C质粒购自Invitrogen(USA)。

1.2 限制性内切酶及试剂

质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;胶回收试剂盒、2 \times Taq PCR mastermix 购自TIANGEN公司;限制性内切酶、T载体及T4 DNA连接酶均购自TaKaRa公司;三丁酸甘油酯为J & K Chemical公司产品;对硝基苯酚(p-NP)、对硝基苯乙酸酯均购自Sigma公司。

1.3 培养基

LB培养基、LLB培养基、YPD培养基、BMG培养基及BMMY培养基配制均按照Invitrogen公司毕赤酵母操作手册进行。筛选培养基参照参考文献[8-9]。

2 方法

2.1 菌株的筛选及鉴定

将鲍鱼内脏破碎并适当稀释后涂布于筛选培养基上,30 $^{\circ}$ C恒温培养36-72 h,观察菌落周围的透明圈情况,出现透明圈的菌株即为产酯酶的菌株。从中筛选到一株能降解三丁酸甘油酯且透明圈较大的菌株,命名为Strain A,并用细菌鉴定16S rDNA通用引物27F和1492R进行分析。获得的序列委托Invitrogen公司进行测序。

2.2 酯酶基因的克隆

为获得相应目的基因片段*estA*,根据该菌株的16S rDNA鉴定结果,在NCBI上找到该类菌酯酶的核苷酸保守序列并设计引物。上游引物 $estF$: 5'-CGGAATTCAATTCGGACACCCAGTCAAT-3',含EcoR I酶切位点与保护碱基(下划线标注),下游引物 $estR$: 5'-CCTCGAGGTTA GTCACGATC GAGTGCAT-3',含Xho I酶切位点与保护碱基。引物合成由生工生物工程上海有限公司合成。以不

动杆菌 Strain A 基因组为模板, *estF* 与 *estR* 为引物进行 TD-PCR, 扩增目的基因。扩增条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min (20 个循环, 每个循环降 0.5 °C); 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min (10 个循环); 72 °C 10 min。PCR 结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯照射下将目的条带割胶回收。

2.3 表达载体的构建

将获取的目的片段用限制性内切酶 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切后, 并同时用相同的酶处理质粒 pPICZα-C, 将酶切后的目的片段与质粒用 T4 DNA 连接酶 4 °C 连接过夜, 转化至大肠杆菌 Top10 感受态细胞中。复苏后涂布于含 Zeocin 抗性(浓度 25 mg/L)的平板上, 37 °C 培养过夜。第 2 天挑取转化子进行 PCR 验证。将阳性克隆子接入 5 mL LB 液体中, 37 °C 培养过夜。提取验证获得的阳性转化子的质粒, 用 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切验证, 条带正确后委托上海 Invitrogen 公司进行测序。

2.4 酯酶的表达与纯化

将构建好的重组质粒 pPICZα-C-*estA* 经 *Sac* I 线性化后, 通过电转化方法转入毕赤酵母 X33 感受态中。转化物涂布于 YPD (Zeocin 浓度 100 mg/L) 平板上, 30 °C 培养 48 h。挑选转化子利用特异引物和毕赤酵母通用引物进行菌落 PCR 筛选阳性转化子。挑取阳性克隆接种于 BMG 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养过夜, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 再用 BMMY 培养基重悬细胞后 28 °C、200 r/min 培养 5 d, 每隔 24 h 添加甲醇至 0.5% 浓度, 从而诱导重组酯酶的表达。

诱导表达后的酯酶第一步先经饱和度为 60% 的硫酸铵盐析, 4 °C 放置过夜后, 10 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液, 将沉淀溶解在缓冲液(pH 8.0 的 50 mmol/L Tris-HCl)中, 过夜透析。由于酯酶的等电点在 4.5 左右, 所以选用 DEAE-Sephadex 阴离子交换柱进行初步分离纯化, DEAE 先经 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液平衡, 上样后

用 0–0.5 mol/L 的 NaCl 梯度洗脱, 最后根据分子筛原理选用葡聚糖凝胶 G75 对目的蛋白进行进一步纯化, SDS-PAGE 电泳检测纯化后的蛋白条带^[10–11]。

2.5 酯酶酶活的测定

参照文献[12]采用 p-NP 比色法测酶活, 底物为对硝基苯乙酸乙酯(pNPC₂), 将 pNPC₂ 用乙腈溶解, 使其终浓度为 10 mmol/L。总反应体系为 1 mL, 先将 20 μL 10 mmol/L 底物加入到 50 mmol/L pH 8.0 的磷酸缓冲液中预热, 再加入 100 μL 酶液, 于 40 °C 准确反应 15 min 后于 404 nm 测定其吸光度值。以灭活的酶液为空白, 每分钟分解对硝基苯乙酸乙酯释放出 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量定义为 1 个酶活力单位, 以 U 表示。

2.6 SDS-PAGE 蛋白电泳

分别将重组转化子和空载诱导培养 3 d, 取上清液按文献[13]进行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳, 考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后检测目的蛋白条带。

2.7 重组酯酶的酶学性质

2.7.1 酶的最适作用温度: 取一定量的酶液, 分别放在 30–60 °C (间隔 5 °C) 水浴中反应, 用 p-NP 比色法测定其在不同温度下的酶活力。将最高酶活定义为 100% 计算其相对酶活。

2.7.2 酶的最适作用 pH: 配制不同 pH 的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液(pH 5.5–9.0), 向酶反应体系中添加不同 pH 的缓冲液(每隔 0.5 个 pH 单位为一个梯度), 在最适反应温度下, p-NP 比色法测定其在不同 pH 下的酶活力。将最高酶活定义为 100%, 计算其相对酶活。

2.7.3 酶的温度稳定性: 将一定量的酶液, 分别放置在 30–80 °C (间隔 10 °C) 的水浴锅内保温, 放置 3 h 后在最适反应温度和反应 pH 值的条件下, 用 p-NP 比色法测定其在不同温度下的残余酶活。

2.7.4 酶的 pH 稳定性: 在 pH 3.0–10.0 (每隔 1.0 个 pH 单位为一个梯度) 的不同 pH 缓冲液范围内, 将酶液按比例分别与不同的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 10.0)磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液

(pH 6.0–9.0)和醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.0–5.0)混合,使其达到预定的 pH。室温放置 5 h 后,在最适反应温度和最适反应 pH 下用 p-NP 比色法测定其在不同 pH 下的残余酶活。

3 结果与分析

3.1 菌株的 16S rDNA 鉴定结果

测序得到 Strain A 菌株的 16S rDNA 序列为 1 612 bp, NCBI BLAST 进行序列比对后利用 MEGA 5 软件构建 A 菌株的系统发育树,如图 1 所示。结果表明 Strain A 菌株与 *Acinetobacter* sp. CIP 56.2 菌株(GenBank 登录号 JQ638585.1)和 *Acinetobacter* sp. strain MN33 (GenBank 登录号 FM213385.2)菌株序列的相似性最高为100%,初步判定为 *Acinetobacter* sp.菌属。

3.2 酯酶基因的克隆

以 Strain A 的基因组为模板扩增酯酶基因,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 所示,可见在 750–1 000 bp 左右有一条较亮的条带,大小与目的片段长度一致。Invitrogen 测序结果分析表明该条基因全长为 912 bp (GenBank 登录号 KJ019019),编码 303 个氨基酸,预测该蛋白分子量大小约为 33 kD (<http://www.expasy.org/>)。在线预测该蛋白信号肽表明前 1–19 个氨基酸为信号肽

序列(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。为了防止信号肽影响可溶性蛋白的顺利表达,引物设计时已去除该段序列。将该蛋白的氨基酸序列与其它相关蛋白进行比对(图 3),发现 *estA* 与 *Acinetobacter* sp. CIP 110321 酯酶基因(GenBank 登录号 WP_016162427.1)氨基酸序列相似性 99%,而与 *Acinetobacter guillouiae* 酯酶(GenBank 登录号 WP_004818371.1)一致性只有 65.46%,相比之下 *estA* 含有更多的亮氨酸和组氨酸位点,组氨酸、丝氨酸和天冬氨酸可以组成催化三联体,催化水解反应的进行。同多数酯酶一致,本研究中的 *estA* 序列含有 α/β 水解酶家族的五肽保守区域 GX SXG (下划黑框所示)^[14]以及天门冬氨酸和组氨酸活性位点。

3.3 酯酶的诱导表达与纯化

Alon R. N.等^[15]报道了 *Acinetobacter lwoffii* 菌株来源的酯酶在大肠杆菌中进行异源表达,表达后只有经过纯化才能获得有活性的酯酶。然而,重组该 EstA 酯酶蛋白在 *P. pastoris* 中的表达几乎未见报道。

在本研究中,按照方法 2.2.3 构建重组质粒 pPICZa-C-*estA*,重组质粒经 *EcoR* I 与 *Xho* I 双酶切验证,线性化后转入毕赤酵母细胞。在毕赤酵母 X33 中的 AOX1 启动子的转录调控下 EstA 成功获

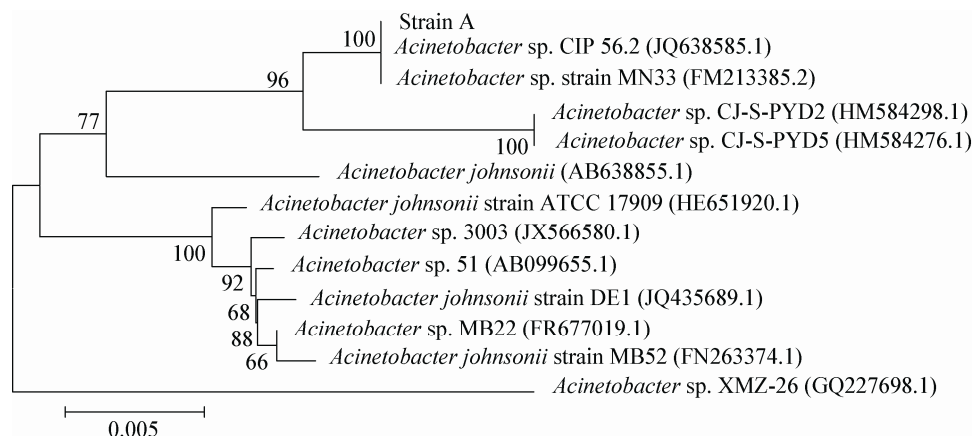


图 1 Strain A 菌株的系统进化树分析

Figure 1 Phylogenetic tree of strain A based on 16S rDNA sequence homology

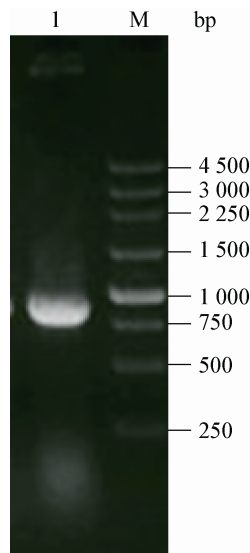


图2 酯酶基因的 PCR 扩增

Figure 2 Analysis of PCR production of *estA* gene in 1% agarose gel

注: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: *estA* 基因 PCR 产物。

Note: M: 250 bp DNA ladder marker; 1: PCR production of *estA* gene.

WP_004826058.1	..MNSAL	KOYL	TESI	LKSS	FKF	PSRF	NLP	PAT	ARF	AI	EOL	AR	VF	PORK	DVOI	RPL	RI	AGI	RAEEI	KP	QAST	OM	LHI	HG	78																																																							
WP_004818371.1	MKI	NSAL	KOYL	TESI	LKSS	FKF	PSRF	NLP	PAT	ARF	GI	EOL	AR	VF	PORK	DVOI	RS	LRI	AGI	RAEEI	KP	QAHAT	OM	FHI	HG	80																																																						
WP_004870058.1	MKI	DP	AI	KOFL	TEKI	LKVS	FKAP	SRMN	LSPT	FMRA	LE	QMS	KVF	POS	KNVOL	RP	VRI	AGI	HAEEI	KP	QS	KST	OM	FHI	HG	80																																																						
WP_005407161.1	MKI	DP	I	F	KOFL	AE	SL	LKSL	VR	KPS	OF	AL	PL	P	VL	RT	AF	NOL	GR	VF	PKN	PE	VEI	RAL	RL	AGV	RAEEI	KP	OP	NAT	OM	LHI	HG	80																																														
WP_004813795.1	MKI	S	PL	T	KOL	I	TET	L	KTS	I	RKPS	O	F	N	L	P	T	AL	R	KALE	O	F	C	K	L	F	P	V	D	K	N	I	E	I	R	S	L	K	L	AG	L	NAEEI	KP	QOEAT	OL	I	FHI	HG	80																															
Esterase	MKF	AT	VW	KY	YF	T	ES	L	L	K	A	T	I	R	T	P	S	O	F	N	L	P	P	T	AL	R	K	AL	E	O	F	C	K	L	F	P	V	D	K	N	I	E	I	R	S	L	K	L	AG	L	NAEEI	KP	QOEAT	OL	I	FHI	HG	80																						
WP_016162427.1	MKF	AT	VW	KY	YF	T	ES	L	L	K	A	T	I	R	T	P	S	O	F	N	L	P	P	T	AL	R	K	AL	E	O	F	C	K	L	F	P	V	D	K	N	I	E	I	R	S	L	K	L	AG	L	NAEEI	KP	QOEAT	OL	I	FHI	HG	80																						
WP_004826058.1	GAF	F	V	G	S	L	K	T	H	R	A	F	L	S	E	V	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	N	K	F	P	E	A	G	D	A	I	Y	D	V	O	O	L	L	D	O	G	I	O	P	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	158						
WP_004818371.1	GAF	F	V	G	S	I	K	T	H	R	A	F	L	S	E	V	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	S	K	F	P	E	A	G	D	A	I	Y	D	I	Y	O	O	L	L	D	O	G	V	O	A	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160					
WP_004870058.1	GAF	F	V	G	S	I	K	T	H	R	A	F	L	S	E	V	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	N	K	F	P	E	A	G	D	A	I	Y	D	V	Y	S	T	L	L	D	O	G	V	L	A	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160					
WP_005407161.1	GAF	F	L	G	L	G	L	A	T	H	R	S	F	M	T	E	L	A	A	R	T	O	M	O	V	V	H	I	D	Y	P	L	A	P	E	H	P	Y	P	E	A	L	E	A	V	Y	D	I	Y	O	T	L	L	D	O	D	I	O	P	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160			
WP_004813795.1	GAF	F	L	G	S	M	K	T	H	R	A	F	M	T	O	I	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	A	P	Y	P	A	L	D	A	V	F	N	V	M	O	L	L	D	O	G	V	O	A	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160							
Esterase	GAF	F	L	G	S	L	N	T	H	R	A	L	M	T	D	I	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	H	P	Y	P	E	A	L	D	A	I	F	D	V	Y	O	A	L	L	V	O	G	I	K	P	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160					
WP_016162427.1	GAF	F	L	G	S	L	N	T	H	R	A	L	M	T	D	I	A	A	R	T	O	M	O	V	L	H	D	Y	P	L	A	P	E	H	P	Y	P	E	A	L	D	A	I	F	D	V	Y	O	A	L	L	V	O	G	I	K	P	K	D	I	I	S	G	D	S	C	G	A	N	L	A	L	A	L	160					
WP_004826058.1	RI	K	A	E	N	K	O	O	L	P	S	A	L	I	L	M	S	P	F	L	D	L	T	L	T	G	E	S	L	R	Y	N	O	K	H	D	A	L	L	S	I	E	A	L	E	S	G	I	D	F	Y	V	P	K	H	L	D	R	S	L	P	A	L	S	P	I	F	G	D	F	E	G	L	P	P	T	L	V	O	238
WP_004818371.1	RI	K	O	E	N	K	O	O	L	P	S	A	L	I	L	M	S	P	F	L	D	L	T	L	T	G	E	S	L	R	Y	N	O	K	H	D	A	L	L	S	I	E	A	L	E	S	G	I	D	F	Y	V	P	K	N	M	D	R	S	L	P	P	L	S	P	I	F	G	D	F	A	G	L	P	P	T	L	V	O	240
WP_004870058.1	RL	K	O	E	D	.	L	E	M	P	S	G	L	M	L	S	P	F	L	D	L	T	L	T	S	E	S	L	R	Y	N	E	K	L	D	A	L	L	S	V	E	A	L	E	T	G	I	S	F	Y	L	P	K	N	I	D	K	S	D	P	F	V	S	P	I	F	G	D	F	A	G	L	P	P	T	L	V	O	239	
WP_005407161.1	RL	K	O	N	E	.	O	P	L	P	S	A	L	V	L	M	S	P	F	L	D	L	T	L	T	S	E	S	L	R	Y	N	R	K	L	D	A	L	L	S	V	E	L	L	E	R	G	I	E	Y	Y	V	P	P	S	I	D	T	A	D	P	O	V	S	P	L	F	G	D	F	S	G	L	P	P	T	L	V	O	239
WP_004813795.1	KI	O	K	L	E	.	L	L	O	P	S	G	L	L	L	S	P	F	V	D	L	T	L	T	S	E	S	L	R	Y	N	R	V	H	D	A	L	L	S	I	E	T	L	E	S	G	I	O	Y	Y	V	P	S	S	I	E	H	G	N	P	E	V	S	P	Y	F	A	D	L	T	G	L	P	P	M	H	I	O	239	
Esterase	RL	K	O	O	P	.	E	L	M	P	S	G	L	L	M	S	P	Y	L	D	L	T	L	T	S	E	S	L	R	F	N	O	K	H	D	A	L	L	S	I	E	A	L	O	A	G	I	N	H	Y	L	T	D	N	I	O	A	D	D	P	R	V	S	P	L	F	D	D	L	K	G	L	P	P	T	L	V	O	239	
WP_016162427.1	RL	K	O	Q	P	.	E	L	M	P	S	G	L	L	M	S	P	Y	L	D	L	T	L	T	S	E	S	L	R	F	N	O	K	H	D	A	L	L	S	I	E	A	L	O	A	G	I	N	H	Y	L	T	D	N	I	O	A	D	D	P	R	V	S	P	L	F	D	D	L	K	G	L	P	P	T	L	V	O	239	
WP_004826058.1	I	G	S	K	E	I	L	L	S	D	A	O	R	F	E	E	K	A	K	A	A	G	V	O	N	Y	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	S	P	W	F	E	E	A	K	O	S	L	A	D	L	A	E	F	A	H	K	I	D	O	301																	
WP_004818371.1	I	G	S	K	E	I	L	L	S	D	A	O	R	F	E	E	K	A	K	A	A	G	V	O	N	Y	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	S	P	W	F	E	E	A	K	O	S	L	A	D	L	A	E	F	A	H	K	I	D	K	303																	
WP_004870058.1	V	G	S	K	E	I	L	L	D	D	A	K	R	F	E	D	K	A	K	A	B	A	G	V	D	R	Y	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	S	P	W	F	E	E	A	K	K	A	I	A	D	I	A	D	F	A	H	K	L	D	K	302																
WP_005407161.1	V	G	S	K	E	I	L	L	D	D	A	O	R	F	E	K	A	G	A	G	V	E	V	D	F	K	I	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	S	A	W	F	D	E	S	K	O	A	L	A	D	L	S	E	F	A	H	R	I	D	R	302																		
WP_004813795.1	V	G	S	K	E	I	L	L	D	D	A	O	R	L	R	D	K	A	L	A	A	G	V	E	F	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	S	A	W	F	D	E	A	R	O	S	L	A	D	L	A	D	F	A	H	R	L	D	R	302																		
Esterase	V	G	S	K	E	I	L	L	D	D	S	K	R	F	E	K	A	E	O	A	D	V	K	V	O	F	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	N	A	W	F	E	A	K	O	A	L	A	D	L	A	E	F	A	H	A	L	D	R	302																		
WP_016162427.1	V	G	S	K	E	I	L	L	D	D	S	K	R	F	E	K	A	E	K	A	D	V	K	V	O	F	K	L	Y	T	G	M	W	H	N	F	O	M	F	N	A	W	F	E	A	K	O	A	L	A	D	L	A	E	F	A	H	A	I	D	R	302																		

图3 酯酶与其它相关蛋白的比对

Figure 3 Amino acid sequence alignment of esterase with other related proteins

注: 黑色方框处为保守的区域, 深色背景为完全一样的区域, 灰色背景的是相似区域。

Note: Black box indicate amino acids constituting the conservative region. Identical and similar amino acids are shaded in black and gray, respectively.

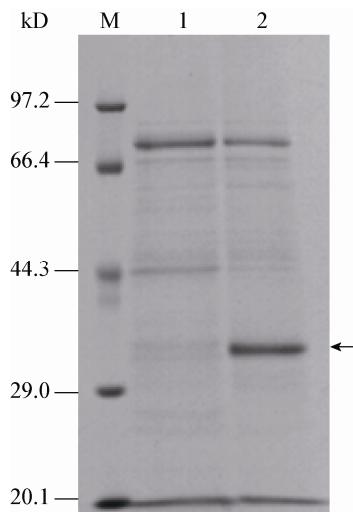


图 4 SDS-PAGE 分析发酵上清液
Figure 4 SDS-PAGE analysis of fermentation supernatant
注：M：蛋白质分子量标准(低)；1：空载发酵液；2：诱导 3 d 后的发酵液。
Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Control supernatant; 2: Fermentation supernatant for 3 d.

酶比活较高峰的酶液，继续用 Sephadex G-75 对目标蛋白进一步进行分离纯化。每步纯化后都进行 SDS-PAGE 蛋白电泳验证。将每一步的纯化回收结果绘制成纯化回收表，如表 1 所示。纯化后的酯酶呈现一条单一的蛋白条带，如图 5 所示。

3.4 重组酯酶酶学性质研究

以 50 mmol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠为缓冲体系，对硝基苯乙酸酯(pNPC₂)为底物，研究不同 pH、不同温度对重组酯酶酶活的影响。酯酶最适

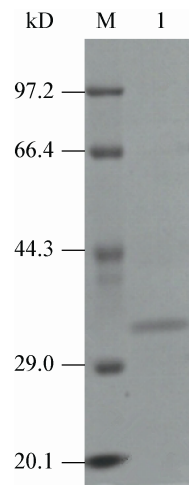


图 5 SDS-PAGE 分析纯化后酯酶
Figure 5 SDS-PAGE analysis of purified esterase
注：M：蛋白质分子量标准(低)；1：纯化后酯酶。
Note: M: Protein molecular weight marker; 1: Purified esterase.

反应温度实验(图 6A)表明，重组酯酶与对硝基苯乙酸酯的最适作用温度为 40 °C，温度高于 45 °C 时不利于酶活的测定。温度稳定性实验表明，在温度低于 60 °C 时该重组酯酶很稳定，放置 3 h 后仍保持着 85%以上的酶活力。而在 80 °C 保温 3 h 酶活力仅剩原活力的 20%左右，结果显示该重组酯酶在温度低于 60 °C 时稳定性较好，有较宽的温度承受范围(图 6 B)。最适反应 pH 实验中(图 6 C)，酯酶最适反应 pH 为 8.0。在 pH 8.0–10.0 范围内该酯酶酶活力保持在 90%–100%左右，而在 pH 3.0–4.0 时相对酶活力只有 20%–50% (图 6 D)，说明该酯酶在碱性条件下很稳定，为碱性酯酶。

表 1 重组酯酶纯化表					
Table 1 Purification of the recombinant esterase					
纯化步骤 Purification step	酶活 Enzyme activity (U/L)	总蛋白 Total protein (mg/L)	比活 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purity (fold)	回收率 Yield (%)
发酵液 Crude extract	1 310.89	172.46	7.60	1.00	100
脱盐 Desalting	2 043.05	215.57	9.48	1.25	31.17
DEAE 离子交换 DEAE ion-exchange	281.91	10.72	26.30	3.46	13.79
G-75 凝胶过滤 G-75 gel-filtration	137.23	5.03	27.28	3.59	10.47

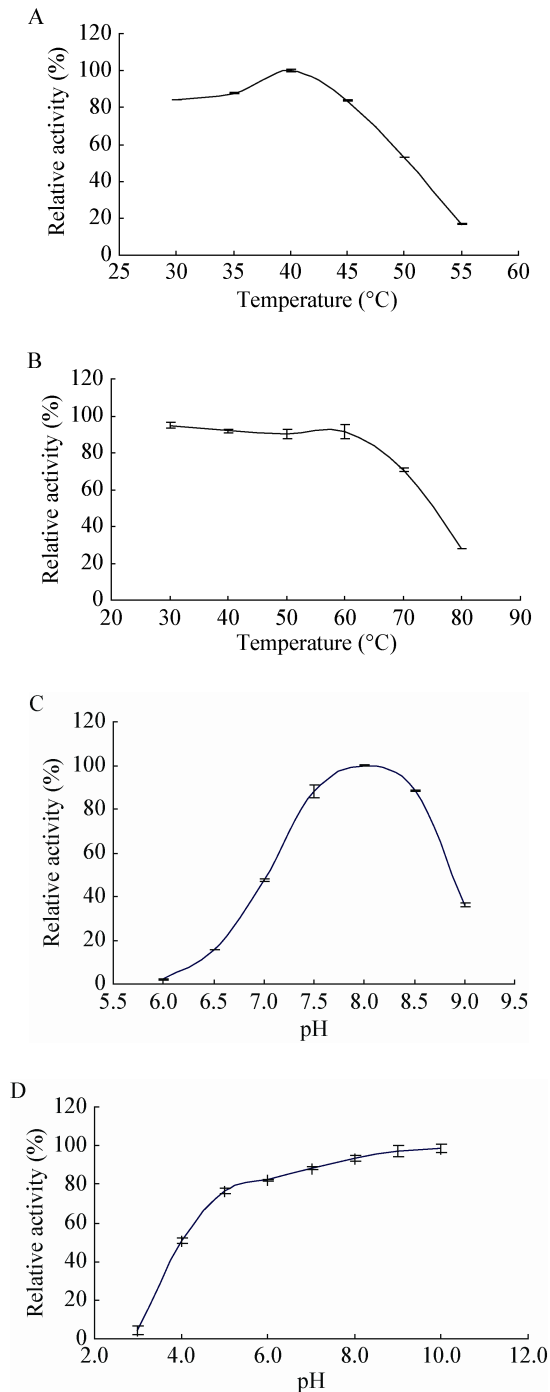


图 6 重组酯酶酶学性质分析

Figure 6 Effect of temperature and pH on activity and stability of the recombinant esterase

注: A: 酶反应最适作用温度; B: 酶最适作用 pH; C: 酶的温度稳定性; D: 酶的 pH 稳定性。

Note: A: Effects of temperature on enzyme activity; B: Effects of pH on enzyme activity; C: Effects of temperature on enzyme stability; D: Effects of pH on enzyme stability.

4 讨论

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近几年发展起来的较为完善的,被广泛用来表达外源蛋白的甲醇营养型表达系统,具有很多表达外源蛋白的优势^[16]。本研究从鲍鱼内脏中筛选到一株产酯酶的不动杆菌,并将酯酶基因在毕赤酵母 X33 中表达,甲醇诱导后上清液酶活力为 1 200 U/L,比原始菌株酶活提高了 8 倍,表明毕赤酵母对不动杆菌 Strain A 来说是一个有效的酯酶表达系统。海洋来源微生物酯酶的最适反应温度一般大于 40 °C,最适 pH 一般大于 8.0,如 Kim Y. O.等^[17]发现的 *Acinetobacter venetians* V28 酯酶最适作用温度为 40 °C,最适反应 pH 9.0; Luo Z. H.等^[18]从海岸沉积物中筛选到的 *Fusarium* 菌属中筛到的酯酶最适反应温度为 50 °C,最适反应 pH 8.0; Zhu Y. 等^[19]利用宏基因组文库的方法从东太平洋 3 191 m 的深海地区筛到的酯酶基因表达后最适反应温度为 60 °C,最适反应 pH 8.0。而本研究中表达的酯酶具有较低的最适反应温度和较高 pH。对该重组酯酶进行温度和 pH 的研究表明该酯酶为碱性酯酶,最适作用 pH 和温度分别为 8.0 和 40 °C。具有耐碱性和较好的耐热性,当温度为 70 °C 条件下,保温 3 h 后酶活力还能保持 60%。这些性质表明该酶具有潜在的工业应用价值,本研究为今后酯酶的研究奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 包兴艳, 郝建华, 陈世建, 等. 产酯酶 B1 海洋枯草芽孢杆菌 C5 发酵条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2012, 18(6): 999-1003.
- [2] Panda T, Gowrishankar BS. Production and applications of esterases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(2): 160-169.
- [3] 徐士庆, 胡永飞, 袁爱花, 等. 深海沉积物微生物元基因组文库来源的新的酯酶基因的克隆表达及酶学性质[J]. 微生物学报, 2010, 50(7): 891-896.
- [4] 宋水山. *Ralstonia eutropha* CH34 酯酶基因的克隆和序列分析[J]. 微生物学报, 2001, 41(4): 402-407.
- [5] 邵铁娟, 孙谧, 郑家声. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 789-793.

- [6] 郑鸿飞, 孙谧, 王跃军, 等. 产酯酶海洋微生物的筛选、鉴定及系统发育分析[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(3): 68-73.
- [7] Zhang C, Kim SK. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects[J]. Marine Drugs, 2010, 8(6): 1920-1934.
- [8] 郑小梅. 脂肪酶产生菌的筛选及其脂肪酶基因的克隆[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2009.
- [9] Ranjitha P, Karthy ES, Mohankumar A. Purification and characterization of the Lipase from marine *Vibrio fischeri*[J]. International Journal of Biology, 2009, 1(2): 48-55.
- [10] Maruyama K, Akita K, Naitou C, et al. Purification and characterization of an esterase hydrolyzing monoalkyl phthalates from *Micrococcus* sp. YGJ1[J]. The Journal of Biochemistry, 2005, 137(1): 27-32.
- [11] Jaouani A, Neifar M, Hamza A, et al. Purification and characterization of a highly thermostable esterase from the actinobacterium *Geodermatophilus obscurus* strain G20[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(6): 653-660.
- [12] Chandrasekaran G, Kim GJ, Shin HJ. Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*[J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1376-1381.
- [13] Nam JK, Park YJ, Lee HB. Cloning, expression, purification, and characterization of a thermostable esterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* p1[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 94: 95-103.
- [14] Park SY, Kim JT, Kang SG, et al. A new esterase showing similarity to putative dienelactone hydrolase from a strict marine bacterium, *Vibrio* sp. GMD509[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 77(1): 107-115.
- [15] Alon RN, Gutnick DL. Esterase from the oil-degrading *Acinetobacter lwoffii* RAG-1: sequence analysis and over-expression in *Escherichia coli*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1993, 112(3): 275-280.
- [16] 刘羽, 王能飞, 黄亦钧, 等. 低温脂肪酶基因在毕赤酵母中的表达研究[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(1): 155-162.
- [17] Kim YO, Heo YL, Kim HK, et al. Gene cloning and characterization of a cold-adapted esterase from *Acinetobacter venetianus* V28[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(9): 1245-1252.
- [18] Luo ZH, Wu YR, Chow RKK, et al. Purification and characterization of an intracellular esterase from a *Fusarium* species capable of degrading dimethyl terephthalate[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(5): 687-693.
- [19] Zhu Y, Li J, Cai H, et al. Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library[J]. Microbiological Research, 2013, 168(9): 589-597.

编辑部公告

《微生物学通报》英文刊名

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本刊编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自2010年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。