

解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2 的表面展示 及其酶学性质

刘文山 赵鹤云 贾彬 徐莉 闫云君*

(华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074)

摘要: 表面展示酶作为全细胞催化剂具备诸如能提高酶的稳定性、省去纯化过程、节约成本等优点。脂肪酶是应用最为广泛的工业酶之一。本研究利用酿酒酵母细胞壁蛋白 Cwp2 作为锚定蛋白, 将解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2 展示在酿酒酵母细胞表面, 以制备脂肪酶全细胞催化剂。Lip2 被融合到 Cwp2 的 N 端, Cwp2 通过其 C 端的 GPI 锚定信号共价结合到细胞壁上。表面展示的 Lip2 可以水解三丁酸甘油酯及对硝基苯酚辛酸酯(pNPC), 其 pNPC 水解酶活达到 4.6 U/g 干细胞。作为全细胞催化剂, 表面展示的 Lip2 具备良好的催化特征, 其最适温度为 40°C, 最适 pH 为 8.0, 同时还具备良好的有机溶剂稳定性。

关键词: 脂肪酶, 解脂耶氏酵母, 酿酒酵母, 表面展示, 全细胞催化剂

Cell Surface Display of *Yarrowia lipolytica* Lipase Lip2 by *Saccharomyces cerevisiae* and Its Practical Properties

LIU Wen-Shan ZHAO He-Yun JIA Bin XU Li YAN Yun-Jun*

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract: Surface display of enzymes has been employed to improve stability of enzymes, and further save tedious purification process of enzymes to be used in conventional immobilization. Lipase is widely applied in industry. In this study, we constructed a *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* on the cell surface. The gene encoding mature Lip2 was fused with the genes encoding the Kre1p leader sequence and the C-terminal domain of Cwp2 including the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor attachment signal. The Lip2 displayed on the yeast cell surface remained hydrolysis activity of lipase. The measured activity of the displayed lipase was 4.6 U/g dry cells. The displayed lipase was also characterized for its potentiality as a whole-cell biocatalyst. Its maximal activity was observed at 40°C and pH 8.0, and it exhibited good thermostability and high tolerance to organic solvent.

Keywords: Lipase, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, Surface display, Whole-cell biocatalyst

基金项目: 国家高技术研究与发展计划项目(No. 2006AA020203, 2007AA05Z417, 2007AA100703, 2009AA03Z232); 新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-07-0336); 武汉市重点攻关计划(No. 200720422138)

* 通讯作者: Tel: 86-27-87792213; Fax: 86-27-87792213; 电子邮箱: yanyunju@im.ac.cn
收稿日期: 2009-08-11; 接受日期: 2009-11-28

自 Smith 首次将外源蛋白展示在噬菌体表面从而开创表面展示技术以来, 微生物表面展示技术发展十分迅速, 已被用于全细胞催化剂制备等广泛领域^[1-2]。由于酶蛋白通常在游离状态下存在稳定性差、不可回收再利用等缺点, 且传统固定化酶需要繁琐的酶分离纯化以及后续固定化过程, 因此表面展示酶蛋白作为全细胞催化剂已成为一种前景广阔的固定化酶制备方法。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 细胞较大, 细胞壁坚硬, 是制备全细胞催化剂最常用的真核宿主之一。目前已有多种工业酶(如淀粉酶、纤维素酶等)被成功展示在酿酒酵母细胞表面作为全细胞催化剂^[3]。

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一类在食品及医药等行业应用广泛的酶类^[4]。酿酒酵母被认为是 GRAS 生物(Generally recognized as safe), 且遗传背景清晰。因此, 酿酒酵母十分适合作为宿主制备脂肪酶的全细胞催化剂。目前, 仅少数脂肪酶利用结构复杂的絮凝素 Flo1、 α 凝集素和 α 凝集素等进行了表面展示研究^[3], 未见有利用结构相对简单的 Cwp2 进行脂肪酶表面展示的报道。解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)胞外脂肪酶 Lip2 是一种优良脂肪酶, 具备很高的水解、酯化、转酯活性, 已被应用到酯合成、对映体拆分、生物柴油合成等领域^[5-8], 但目前均以小批量游离态酶形式予以应用, 温度稳定性差, 难以回收再利用, 导致成本较高。为此, 本文拟应用表面展示技术, 以结构相对简单的酿酒酵母细胞壁蛋白 Cwp2 作为锚定蛋白, 将 Lip2 展示在酿酒酵母细胞表面, 以期获得稳定性得到提高、生产成本相对低廉的全细胞催化剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *Y. lipolytica* 菌株(中国科学院微生物所赠送), *Escherichia coli* DH5 α [*F'* *endA1* *hsdR17*(r_K^- / m_K^+) *supE44* *thi-1* λ -*recA1* *gyrA96* Δ *lacU169* (Φ 80*lacZ*DM15)], *S. cerevisiae* INVSc1 (*MATa* *his3D1* *leu2* *trp1*-289 *ura3*-52) (Invitrogen), 表面展示质粒 pFB2 (Frank Breinig 教授赠送)。

1.1.2 培养基: LB、YPD、SD 均按文献[9]配制, 三丁酸甘油酯检测平板为含有三丁酸甘油酯的 SD 平板。

1.1.3 酶与试剂: 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒

(DV805A)为 TaKaRa 公司产品, 质粒小量提取试剂盒(DP103-02)和小鼠抗 HA 抗体为天根公司产品, FITC 标记抗小鼠 IgG 购自 Thermo Scientific 公司, YNB 为 Difco 公司产品, 不同碳链长度羧酸的对硝基苯酚酯(C4、C8、C10、C12、C16)和酸洗玻璃珠均为 Sigma 公司产品。PCR 引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 其他普通生化试剂均为国产分析纯。

1.2 表面展示载体 pFB2-LIP2 的构建

将解脂耶氏酵母菌株接种至 YPD 培养基中 28°C 培养过夜后, 采用酸洗玻璃珠法提取基因组 DNA^[10]。以该基因组为模板, 设计引物 lip2s: 5'-CTTGAATTCTACCCATACGACGTTCCAGACTACGCTGTGTACACCTCTACCGAGAC-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点, 斜体为 HA 标签编码序列)和 lip2a: 5'-CTAGTCGACGATACCACAGACACCCTCGG-3' (下划线为 *Sal* I 酶切位点), 扩增成熟 Lip2 编码基因, PCR 条件为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物和载体 pFB2 分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切, 经凝胶回收试剂盒纯化后用 T4 DNA 连接酶连接, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 α , 经含氨苄青霉素的 LB 平板筛选, 挑取菌落抽提质粒, 经 PCR 和酶切进行鉴定后, 将阳性克隆送至上海英骏生物技术有限公司测序, 以确证其阅读框的正确性。

1.3 酵母转化及筛选

将上述构建成功的质粒 pFB2-LIP2 转化酿酒酵母 INVSc1, 转化采用醋酸锂法^[11]。转化子利用不含尿嘧啶的 SD 选择性培养基进行筛选, 将得到的转化子利用 lip2s 和 lip2a 为引物进行 PCR 验证, 验证质粒是否转入。

1.4 免疫荧光检测

将重组酿酒酵母转接至 SD 培养基中培养一定时间后离心, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后用 250 μ L 含 1 mg/mL BSA 的 PBS 缓冲液重悬并加入 1 μ g 抗 HA 抗体后冰浴 1 h, 离心并用 PBS 缓冲液洗涤后重悬入含 1 mg/mL BSA 的 PBS 缓冲液中, 加入 1 μ g FITC 标记抗小鼠 IgG 后冰浴 1 h。离心并用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后置于荧光显微镜下观察。

1.5 脂肪酶活性检测

1.5.1 脂肪酶酶活的平板检测: 将重组酿酒酵母 INVSc1/pFB2-LIP2 及对照 INVSc1/pFB2 接种到

三丁酸甘油酯检测平板上 28°C 培养 4 d 后观察水解圈。

1.5.2 脂肪酶酶活的定量测定: 将重组酿酒酵母转接至 SD 培养基中培养一定时间后离心, 用 50 mmol/L、pH 8.0 的 Tris-HCl 重悬作为全细胞催化剂。脂肪酶酶活的定量检测采用分光光度法^[12], 将 10 mmol/L pNPC 的乙腈溶液, 无水乙醇和 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液按照 1/4/95 的体积比配制底物溶液, 将上述全细胞加入底物溶液中 40°C 反应 10 min, 利用分光光度计测 OD_{410} 。1 个酶活单位定义为每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚(pNP)所需要的酶量。

1.6 酶学性质测定

1.6.1 最适温度及最适 pH: 通过测定不同温度 (25°C、30°C、35°C、40°C、45°C 和 50°C) 下的 pNPC 水解酶活以确定脂肪酶的最适催化温度。每个温度测 2 次酶活取平均值。通过测定不同 pH (pH 6–7 的磷酸钾缓冲液和 pH 7–9 的 Tris-HCl 缓冲液) 下的 pNPC 水解酶活以确定脂肪酶的最适 pH。每个 pH 值测 2 次酶活取平均值。

1.6.2 温度稳定性及有机溶剂稳定性: 将全细胞置于 45°C 水浴 1–5 h 后, 直接加入 1.5.2 所述的底物溶液中 40°C 反应 10 min, 测定其 pNPC 水解酶活以确定 45°C 下酶活随时间的变化情况。酶活测定条件均为 pH 8.0 和 40°C。为了进一步测定全细胞的有机溶剂稳定性, 将全细胞悬浮液中加入 10% DMSO, 30°C 温浴 0.5 h 后测定其残余酶活, 酶活测定条件同上。

1.6.3 底物的链长特异性: 配制 10 mmol/L 的不同碳链长度羧酸的对硝基苯酚酯(C4、C8、C10、C12、C16)的乙腈溶液, 然后加入 4 倍体积的无水乙醇和 95 倍体积的 pH 8.0 的 Tris-HCl 作为底物溶液, 加入脂肪酶后 40°C 反应 10 min, 测定 OD_{410} 。根据不同底物的水解酶活确定脂肪酶的链长特异性。

2 结果

2.1 表面展示载体 pFB2-LIP2 及重组菌株 INVSc1/pFB2-LIP2 的构建(图 1)

以解脂耶氏酵母基因组为模板 PCR 扩增得到 903 bp 的 Lip2 成熟肽编码序列(不含 TAA 终止密码子), 其 N 端加入了 HA 抗原标签(YPYDVPDYA)编码序列, 可用于免疫荧光检测。将该序列克隆至表面展示载体 pFB2 中 Cwp2 的 C 端 71 个氨基酸编码

序列的 5'端, 使 *LIP2-CWP2* 融合基因处于 PGK 启动子下游。Kre1p 信号序列位于 PGK 启动子与融合蛋白之间, 用于融合蛋白的分泌表达。Cwp2 为酿酒酵母细胞壁蛋白, 其 C 端有一段糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定信号, 融合蛋白通过该信号共价结合到细胞壁 β -1,6-葡聚糖链上。

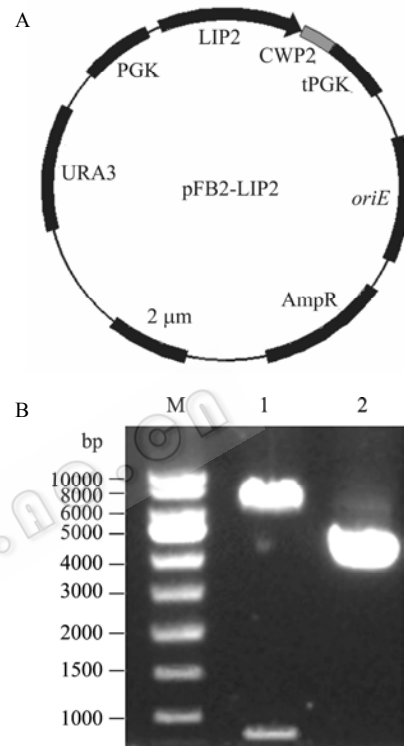


图 1 表面展示质粒 pFB2-LIP2 的构建及酶切验证

Fig. 1 Construction of the plasmid pFB2-LIP2 for cell surface display of Lip2

Note: A: Schematic diagram of plasmid; B: Digestion of plasmid: M: Marker; 1: Digestion of pFB2-LIP2 by *EcoR* I and *Xho* I; 2: pFB2-LIP2.

2.2 脂肪酶表面展示的检测

对重组酵母细胞进行免疫荧光分析, 结果如图 2A 所示, 表面展示 HA-Lip2 的酵母细胞由于抗 HA 抗体及 FITC 标记的二抗的结合而显绿色荧光, 而对照细胞则无荧光。由此可知, Lip2 已经成功的展示到 INVSc1 酵母细胞表面。

为了检测展示的 Lip2 是否仍然保留脂肪酶的活性, 将重组酿酒酵母 INVSc1/pFB2-LIP2 及对照分别接种至三丁酸甘油酯检测平板上。在三丁酸甘油酯平板上可以观察到 INVSc1/pFB2-LIP2 周围有明显的水解圈, 而对照则无明显水解圈, 说明表面展示的 Lip2 具备水解三丁酸甘油酯的能力(图 2B)。为

了进一步定量检测表面展示脂肪酶的活性, 以 pNPC 为底物, 利用分光光度法定量检测脂肪酶酶活, 重组酵母在 SD 中培养 8 h 后, 酶活达到 4.6 U/g 干细胞, 而对照细胞(INVSc1)的酶活为 0。

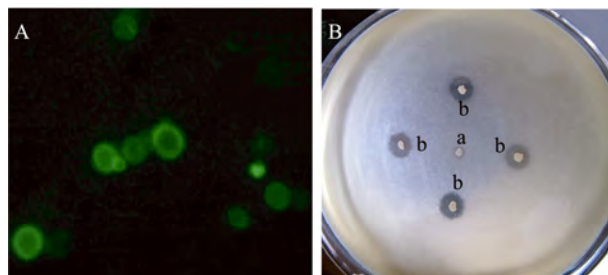


图 2 脂肪酶表面展示的荧光及活性检测

Fig. 2 Confirmation of successful display of active Lip2

Note: A: Immunofluorescence microscopy assay of Lip2-displayed yeast cells; B: Halo assay of displayed Lip2: a: Control cell (INVSc1/pFB2); b: INVSc1/pFB2-LIP2.

2.3 表面展示脂肪酶的最适温度和 pH

由图 3A 可知, 表面展示脂肪酶在低于 40°C 时随着温度升高酶活快速上升, 至 40°C 时酶活达到最大, 高于 40°C 之后酶活则迅速下降, 在 35°C–45°C 之间, 表面展示脂肪酶均保持了 80% 以上的最大酶活。由图 3B 可知, 在小于 pH 8.0 之前, 表面展示脂肪酶酶活随 pH 值增加迅速上升, 而在 pH 8.0 之后则随着 pH 值的增加而更迅速下降。这说明表面展示脂肪酶适于弱碱环境。其最适温度和最适 pH 与 Yu 等^[13]报道的游离态脂肪酶 Lip2 基本一致。

2.4 表面展示脂肪酶的温度稳定性及有机溶剂耐受性

将全细胞置于 45°C 水浴一定时间后, 测定其残余酶活, 结果如图 4 所示。水浴 1 h 后酶活急剧下降至 24.6%, 之后的 4–5 h 内酶活变化不大。而之前 Yu 等^[13]报道游离态 Lip2 酶 45°C 水浴 4 h 后残余酶活基本为 0^[13], 可见表面展示的脂肪酶比游离酶具备更好的温度稳定性。此外, 为了进一步检测全细胞催化剂的有机溶剂稳定性, 以 10% DMSO 处理全细胞催化剂一定时间后测定残余酶活, 结果发现全细胞催化剂具备较好的 DMSO 稳定性, 30°C 处理 0.5 h 后保持 89.4% 的残余酶活, 1 h 后仍保持 88.0% 的残余酶活, 2 h 后残余酶活为 86.5%。与 Yu 等^[13]报道的游离态 Lip2 酶的结果较一致^[13]。

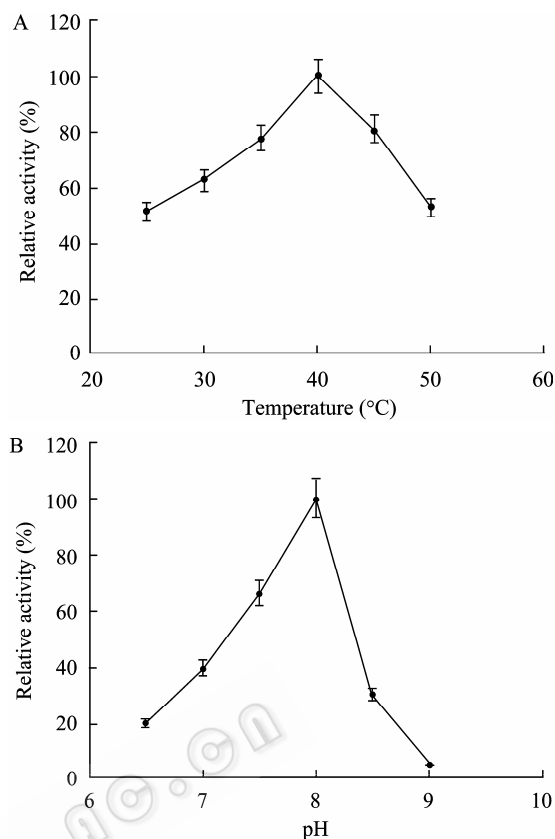


图 3 表面展示脂肪酶的最适温度和最适 pH

Fig. 3 Optimal temperature and pH of the displayed lipase

Note: A: Effect of temperature on the activity of the displayed lipase; B: Effect of pH on the activity of the displayed lipase.

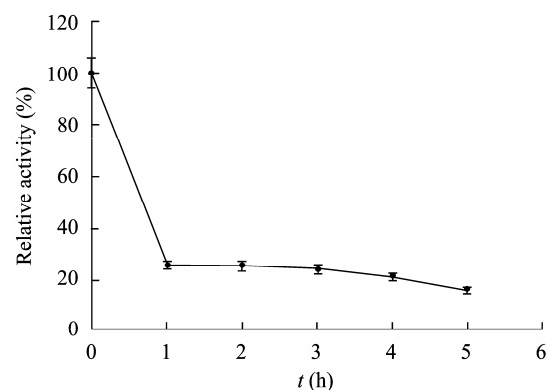


图 4 表面展示脂肪酶的温度稳定性

Fig. 4 Thermostability of the displayed lipase

2.5 表面展示脂肪酶的底物特异性

分别用不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物检测了表面展示脂肪酶 Lip2 的酶活, 结果显示其水解月桂酸(C12)对硝基苯酚酯的酶活最高, 水解 C8、C10、C16 对硝基苯酚酯活性与 C12 对硝基苯酚酯的活性相近, 均远高于对硝基苯酚丁酸酯(C4)的水解酶活(表 1), 表面展示脂肪酶 Lip2 的最适底物为中长链的脂肪酸酯。

表1 表面展示脂肪酶的底物特异性
Table 1 Substrate spectrum of the surface displayed lipase

底物 Substrate	酶活 Specificity activity (U/g dry cell)	相对活力 Relative activity (%)
p-Nitrophenol butyrate (C4)	2.3	46.9
p-Nitrophenyl caprylate (C8)	4.6	93.9
p-Nitrophenol decanoate (C10)	4.1	83.7
p-Nitrophenol laurate (C12)	4.9	100.0
p-Nitrophenol palmitate (C16)	4.3	87.8

3 讨论

目前在酿酒酵母中用于脂肪酶展示的锚定蛋白仅有 α 凝集素、a 凝集素和絮凝素 Flo1^[14-15]。Flo1(1537 个氨基酸残基)结构复杂, 且其 N 端通过非共价键锚定在细胞壁上。而共价结合到细胞壁上的酿酒酵母细胞壁蛋白 Cwp2 则未被用于脂肪酶展示。a 凝集素虽已被用来展示解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2^[15], 但由于其结构复杂, 需要其大亚基(Aga1)与小亚基(Aga2)通过二硫键结合后才能锚定到细胞表面, 操作较为复杂。而锚定蛋白种类的不同对目标展示蛋白的表达活性有着重要影响^[16]。因此, 本文首次尝试利用仅有 71 个氨基酸残基的 Cwp2 (C 端部分)作为锚定蛋白展示解脂耶氏酵母脂肪酶 Lip2, 展示获得的酶活力与之前利用 α 凝集素为锚定蛋白在酿酒酵母表面展示的米根霉脂肪酶所得酶活相当^[17], 但低于利用 a 凝集素展示的 Lip2 的酶活。可能原因是 Lip2 的催化三联体 Ser-Asp-His 在空间结构上与 Cwp2 较靠近, 从而一定程度上影响了其活性构象的形成。但与游离态 Lip2 相比, 展示的 Lip2 酿酒酵母全细胞催化剂具备了更好的温度稳定性, 并保持了相似的最适反应条件、最适底物和良好的有机溶剂稳定性。通过进一步优化锚定蛋白以及利用表面展示技术作为筛选手段对 Lip2 进行定向进化, 可进一步提高展示酶活性及操作稳定性, 为开发出具有高活性、高稳定性的表面展示脂肪酶全细胞催化剂奠定技术基础。

参考文献

- [1] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vector that display cloned antigens on the viron surface. *Science*, 1985, **228**(4705): 1315-1317.
- [2] Saleem M, Brim H, Hussain S, *et al.* Perspectives on microbial cell surface display in bioremediation. *Biotechnol*

Adv, 2008, **26**(2): 151-161.

- [3] Ueda M, Tanaka A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol Adv*, 2000, **18**(2): 121-140.
- [4] Jaeger, KE, Reetz TM. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 1998, **16**(9): 396-403.
- [5] Fickers P, Benetti PH, Wache Y, *et al.* Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res*, 2005, **5**(6/7): 527-543.
- [6] Deng L, Tan TW, Wang F, *et al.* Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida* sp. 99-125. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2003, **105**(12): 727-734.
- [7] Guieysse D, Sandoval G, Faure L, *et al.* New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**(22): 3539-3543.
- [8] He XL, Chen BQ, Tan TW. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, **18**(4/6): 333-339.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2003: 1595-1604.
- [10] Babour A, Beckerich JM, Gaillardin C. Identification of an UDP-Glc: glycoprotein glucosyltransferase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 2004, **21**(1): 11-24.
- [11] Ito H, Fukuda Y, Murata K, *et al.* Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 1983, **153**(1): 163-168.
- [12] Lee SH, Choi JI, Park SJ, *et al.* Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(9): 5074-5080.
- [13] Yu MG, Qin SW, Tan TW. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem*, 2007, **42**(3): 384-391.
- [14] Kondo A, Ueda M. Yeast cell surface display-applications of molecular display. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**(1): 28-40.
- [15] 刘文山, 徐莉, 赵鹤云, 等. 利用a凝集素在酿酒酵母表面展示解脂耶氏酵母脂肪酶Lip2. *微生物学报*, 2008, **48**(11): 1543-1548.
- [16] Van der Vaart JM, te Biesebeke R, Chapman JW, *et al.* Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(2): 615-620.
- [17] Washida M, Takahashi S, Ueda M, *et al.* Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**(5/6): 681-686.