

研究报告

来源于海洋细菌 *Altererythrobacter luteolus* SW109^T 的新型酯酶 E29 的克隆表达及其酶学性质

李正阳¹ 戎振¹ 王昭^{1,2} 霍颖异¹ 孟凡旭¹ 王春生¹ 崔恒林² 许学伟^{1*}

(1. 国家海洋局第二海洋研究所 国家海洋局海洋生态系统与生物地球化学重点实验室

浙江 杭州 310012)

(2. 江苏大学食品与生物工程学院 江苏 镇江 212013)

摘要:【目的】克隆表达一个来源于海洋细菌的酯酶 E29, 并研究其酶学性质。【方法】从细菌 *Altererythrobacter luteolus* SW109^T 中筛选并扩增出一个酯酶基因, 将其克隆至 pSMT3 载体上, 并将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行异源表达, 分析表达产物的酶学性质。【结果】氨基酸序列分析结果表明, 酯酶 E29 属于脂类水解酶第二家族(Family II)。酶学性质分析结果显示, 酯酶 E29 的最适反应底物为对硝基苯酚丁酸酯, 最适反应温度为 45 °C, 最适反应 pH 为 8.5; 10 mmol/L 的 Co²⁺ 和 Mn²⁺ 及 15% 的异丙醇和乙腈能强烈抑制酯酶 E29 的活性, 1% 的 SDS 能使酶失活, 甘油的存在能促进酶活性。【结论】酯酶 E29 是一个海洋来源的新型酯酶, 其具有较高的酶活力值、较宽的底物谱以及对部分有机溶剂和金属离子较好的耐受性, 在工业方面具有潜在的应用价值。

关键词: 海洋细菌, 酯酶, 酶学性质, 克隆表达

Cloning, expression and characterization of a novel esterase (E29) from a marine bacterium *Altererythrobacter luteolus* SW109^T

LI Zheng-Yang¹ RONG Zhen¹ WANG Zhao^{1,2} HUO Ying-Yi¹ MENG Fan-Xu¹
WANG Chun-Sheng¹ CUI Heng-Lin² XU Xue-Wei^{1*}

(1. Key Laboratory of Marine Ecosystem and Biogeochemistry, Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

(2. School of Food & Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China)

Abstract: [Objective] We cloned, expressed and characterized a novel esterase E29 from a marine bacterium. [Methods] An assumed esterase gene, which was predicted via the genome of

Foundation item: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2014CB441503); National Natural Science Foundation of China (No. 41506183)

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-571-81963208; E-mail: xuxw@sio.org.cn

Received: November 25, 2015; Accepted: March 14, 2016; Published online (www.cnki.net): March 14, 2016

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(973 计划) (No. 2014CB441503); 国家自然科学基金项目(No. 41506183)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-571-81963208; E-mail: xuxw@sio.org.cn

收稿日期: 2015-11-25; 接受日期: 2016-03-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-14

Altererythrobacter luteolus SW109^T and amplified by PCR, was cloned into expression vector pSMT3. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Subsequently, E29 was obtained via heterogenetic expression and characterized. [Results] The amino acids sequence analysis revealed E29 represents a new member of Family II of lipolytic enzyme. According to biochemical characterization, the maximum hydrolysis activity was obtained using *p*-nitrophenyl butyrate as substrate, at 45 °C and pH 8.5. The activity of E29 decreased in solution containing 10 mmol/L Co²⁺ or Mn²⁺, or 15% isopropanol or acetonitrile. The esterase was inactivated in 1% SDS solution. The addition of glycerol can promote the activity of E29 strikingly. [Conclusion] E29 is a novel marine esterase. Due to its high enzyme activity, wide substrates selectivity as well as tolerance of some organic solvents and metal ions, E29 has potential application in industry.

Keywords: Marine bacterium, Esterase, Characterization, Cloning and expression

酯酶(EC3.1.1.2)是一类能够将脂类通过化学反应分解为酸和醇的水解酶类。酯酶通常存在一个由丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸 3 个氨基酸残基组成的催化三角为其活性中心;其中,丝氨酸残基经常出现在 GX SXG 这样一个保守的五肽序列中^[1]。大部分酯酶催化反应时不需要辅助因子参与,并且对反应底物具有广泛性和一定的立体结构特异性^[2],这些特性使其作为一种生物催化剂越来越受到人们关注。如今,酯酶作为一种环境友好、经济并且清洁的催化剂,在食品、造纸、精细化学合成以及医疗诊断等领域扮演着越来越重要的角色^[3]。工业上应用的酯酶主要来源于不同的生物体内,特别是来自于真菌和细菌^[4],这主要是由于微生物来源的酯酶具有产量高、反应稳定、副产物毒性小及分子生物学操作简单等优点。近年来,随着对酯酶极端反应条件(高温、低温、耐酸、耐碱、耐盐、耐受有机溶剂等)需求的日益增加,从极端环境中分离新型酯酶也引发了人们的普遍关注^[5-7]。

海洋占据了地球表面积的 71%,孕育了丰富的微生物资源,成为新型酯酶的一个巨大宝藏。*Altererythrobacter luteolus* (*Aba. luteolus*, 微黄交替赤杆菌) SW109^T 是一株从海洋环境中分离获得的新种标准菌株,其对酯类具有良好的水解活性^[8-9]。基于全基因组序列的分析结果显示,菌株 SW109 具有一个假定的酯酶基因 *e29*^[10]。本研究克隆表达了 E29,根据氨基酸序列分析探知了其在酯酶家族中的分类地位,并且从底物特异性、温度、反应 pH、

热稳定性、金属离子及有机溶剂耐受性等方面进行了酶学性质研究。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

研究所用的实验菌株 *Aba. luteolus* SW109^T 是从韩国海域水样样品中分离获得的一株细菌^[9],保藏于韩国生物科学与技术研究所(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KRIBB),由 Jung-Hoon Yoon 教授惠赠。*Escherichia coli* BL21(DE3)和 *E. coli* DH5 α 为本实验室保藏菌株。质粒 pSMT3^[11]由复旦大学李继喜教授惠赠。

1.2 试剂和仪器

限制性内切酶、蛋白 Marker、T4 连接酶均购于 New England Biolabs 公司(NEB);DNA Marker 和 Primer STAR GXL DNA 聚合酶购于宝生物工程(上海)有限公司(TaKaRa);细菌基因组提取试剂盒(Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit)购于 Axygen 有限公司;PCR 产物回收试剂盒(Cycle-pure Kit)和琼脂糖凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit)购于 OMEGA 有限公司;胰蛋白酶和酵母提取物购于 OXIOD 有限公司;琼脂粉(Agar)购于 BIOSHARP 有限公司;对硝基苯酚酯和对硝基苯酚标准溶液购于 Sigma-Aldrich 有限公司;其他相关试剂均购于生工生物工程(上海)有限公司。*Aba. luteolus* SW109^T 的全基因组序列是通过高通量测序技术(HiSeq2000 系统, Illumina, 美国)而获得^[12]。

PCR 基因扩增仪(XP cycles),杭州博日科技有

限公司;微型离心机(MICROCL 17)和低温落地式中型离心机(SL40R),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;超声波细胞粉碎机(650Y),上海比朗仪器制造有限公司;Ni-NTA 亲和层析柱(BSP079),生工生物工程(上海)股份有限公司;核酸蛋白分析仪(DU800),贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司。

1.3 培养基和培养条件

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,pH 7.0. 2216 培养基购于美国 BD 公司。

Aba. luteolus SW109^T 培养条件为 30 °C、200 r/min,在 2216 培养基中富集培养;*E. coli* BL21 (DE3)和 *E. coli* DH5 α 培养条件为 37 °C、200 r/min,在 LB 培养基中富集培养。

1.4 序列分析

通过对全基因组序列及其注释分析,得到一个假定的酯酶基因(*e29*),将其氨基酸序列通过 BLASTp 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比对分析。基于 Neighbor-Joining 方法^[13],使用软件 MEGA 6.0 构建系统发育树^[14]。

1.5 克隆表达与纯化

采用细菌基因组提取试剂盒获得 *Aba. luteolus* SW109^T 的基因组 DNA,以其为模板进行聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因片段。PCR 条件和体系为 Primer STAR GXL DNA 聚合酶说明书(<http://www.takara.com.cn/Download/R050A.pdf>)所推荐。所用引物序列为 5'-TCGCGGATCCATGGGGCCGGAACGGCG-3' (斜体下划线表示 *Bam*H I 酶切位点)和 5'-TCCGCTCGAGTCAGCCTGCCGGCTCTTCC-3' (斜体下划线表示 *Xho* I 酶切位点)。PCR 产物经过 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后,克隆到同样酶切处理后的表达载体 pSMT3 上,将重组质粒转入到 *E. coli* BL21(DE3)中富集培养。待培养液 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,在 25 °C、200 r/min 条件下培养过夜。培养液在 4 °C 条件下 5 000×g 离心收集菌体,采用 Buffer A (500 mmol/L 氯化钠,10 mmol/L 咪唑,20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)重悬菌体,并超声波破胞。溶液在 4 °C、12 000×g

高速离心 20 min 后得到的上清液采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白。采用 12% SDS-PAGE 检测洗脱液。采用 Bradford 的方法进行测定蛋白浓度,标准品为小牛血清蛋白^[15]。

1.6 酶活性质分析

标准反应体系(1 mL):10 μ L 0.1 mol/L 对硝基苯酚丁酸酯,980 μ L 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)和 10 μ L 纯化后的酶液。使用核酸蛋白分析仪(DU800)在 45 °C 下连续测定吸光值 A₄₀₅ 变化,并使用失活的酶液作为对照。一个酶活力单位定义为每分钟从对硝基苯酚酯催化产生 1 μ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。将对硝基苯酚^[16]标准品用 100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)配制不同浓度的标准系列,测定其在 45 °C、405 nm 波长下的吸光值^[17],绘制标准曲线,计算得到对硝基苯酚消光系数为 13 208/(mol·cm)。

1.6.1 底物特异性: 分别在反应体系中加入终浓度为 1 mmol/L 不同链长度的对硝基苯酚酯(乙酸酯,C2;丁酸酯,C4;己酸酯,C6;辛酸酯,C8;癸酸酯,C10;十二酸酯,C12;十四酸酯,C14;十六酸酯,C16)。

1.6.2 最适反应温度及热稳定性: 分别在 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 和 65 °C 下连续测定吸光值 A₄₀₅,分析酯酶的最适反应温度。将纯化后的酶液分别保温在 10、20、30、40、50 和 60 °C 条件下 1 h 后测定酶活,分析酶的热稳定性。

1.6.3 最适反应 pH: 分别在不同 pH 条件下连续测定吸光值(A₃₄₈) 3 min,使用的缓冲液包括:100 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 3.0–6.0)、100 mmol/L 磷酸二氢钾-氢氧化钠缓冲液(pH 6.0–7.5)、100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0)和 50 mmol/L 2-环己胺基乙磺酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0–10.0)。

1.6.4 动力学研究: 采用不同浓度的对硝基苯酚丁酸酯测定酯酶的活力,再通过 GraphPad Software 软件中的 Michaelis-Menten equation 来计算 K_m 和 V_{max}^[18]。

1.6.5 金属离子耐受性: 反应体系中分别加入 10 mmol/L Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ba^{2+} 和乙二胺四乙酸(EDTA), 测定酶活。

1.6.6 有机溶剂及去垢剂耐受性: 反应体系中分别加入 15%的有机溶剂(异丙醇、乙腈、甲醇、乙醇、丙酮、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺和甘油)或 1%的去垢剂(SDS、Triton X-100、吐温 20 和吐温 80), 测定酶活。

1.7 核苷酸序列登录号

Aba. luteolus SW109^T的酯酶基因 *e29* 核苷酸序列的 GenBank 登录号为 KU057375。

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过对 *Aba. luteolus* SW109^T的全基因组分析, 获得了一个长度为 573 bp 的开放阅读框(Open reading frame, ORF), 该 ORF 可编码一个大小为 191 氨基酸的蛋白质, 即 E29。通过 BLASTp 比对分析, 发现与之氨基酸序列相似性最高的蛋白为来源 *Porphyrobacter* sp. HL-46 的 Arylesterase, 序列一致性为 71% (表 1)。

1991 年 Arpigny 和 Jaeger^[4]根据氨基酸序列一级结构信息, 将脂类水解酶分为 8 个家族^[4]。将获得的 E29 及其相近的氨基酸序列构建系统发育树, 结果显示, E29 与其他 6 个氨基酸残基序列最相近的蛋白位于同一分支上, 均属于第二家族(Family II) (图 1)。进一步 ClustalW^[13]对比分析结果揭示, E29

具有第二家族所特有的 GDSL 序列^[4]。

2.2 酯酶 E29 的表达与纯化

酯酶 *e29* 基因与表达载体 pSMT3 构建组成一个重组质粒, 并将其转化至宿主 *E. coli* BL21(DE3) 中进行异源表达。通过计算得知酯酶 E29 蛋白的分子量为 21 kD。由于所使用的表达载体 pSMT3 会在表达产物的 C 端增加一个约为 13 kD 的 Sumo (目的是增加蛋白的可溶性表达量), 因此最终获得的蛋白在 SDS-PAGE 上显示约为 34 kD。图 2 为经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后, 不同浓度咪唑洗脱的流出液在 SDS-PAGE 上的结果。

2.3 酯酶 E29 的酶学性质

使用不同侧链长度的对硝基苯酚酯进行酯酶 E29 底物特异性分析, 结果如图 3 所示。当底物为对硝基苯酚丁酸酯(C4)时, 其水解反应活性最高[酶活力值为 150.12 ± 2.60 U/mg, V_{\max} 为 $987.5 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{min})$, K_m 为 0.4775 mmol/L]。从图 3 可知, 酯酶 E29 对较短链的对硝基苯酚酯普遍具有较好的水解能力, 对对硝基苯酚十四酸酯(C14)和对硝基苯酚十六酸酯(C16)也表现出一定的降解作用。

酯酶 E29 的反应温度和反应 pH 分别在 15–60 °C 和 pH 2.0–10.0 的范围内测定。结果显示, E29 的最适反应条件为 45 °C 和 pH 8.5 (图 4 和图 5)。热稳定性实验结果表明, E29 在 10–30 °C 时能保持良好的活性, 而在 50 °C 条件下大幅度失活(图 6)。

表 1 E29 及其相似蛋白之间的比较
Table 1 Comparison of E29 with its similar relatives

蛋白名称 Name of protein	大小 Size (aa)	GenBank 登录号 GenBank accession No.	来源 Source	一致性 Identity (%)	E 值 E value
E29	191	KU057375	<i>Altererythrobacter luteolus</i>	—	—
Arylesterase	249	WP_051930192	<i>Porphyrobacter</i> sp. HL-46	71	6e–89
Arylesterase	193	WP_027443586	<i>Porphyrobacter cryptus</i>	70	5e–87
Lysophospholipase	247	KPP91471	<i>Erythrobacteraceae</i> sp. HL-111	68	6e–84
Arylesterase	244	WP_051698010	<i>Erythrobacter litoralis</i>	67	6e–84
Arylesterase	232	WP_046903184	<i>Altererythrobacter atlanticus</i>	68	2e–83
Arylesterase	243	WP_054119104	<i>Porphyrobacter</i> sp. AAP60	67	3e–83

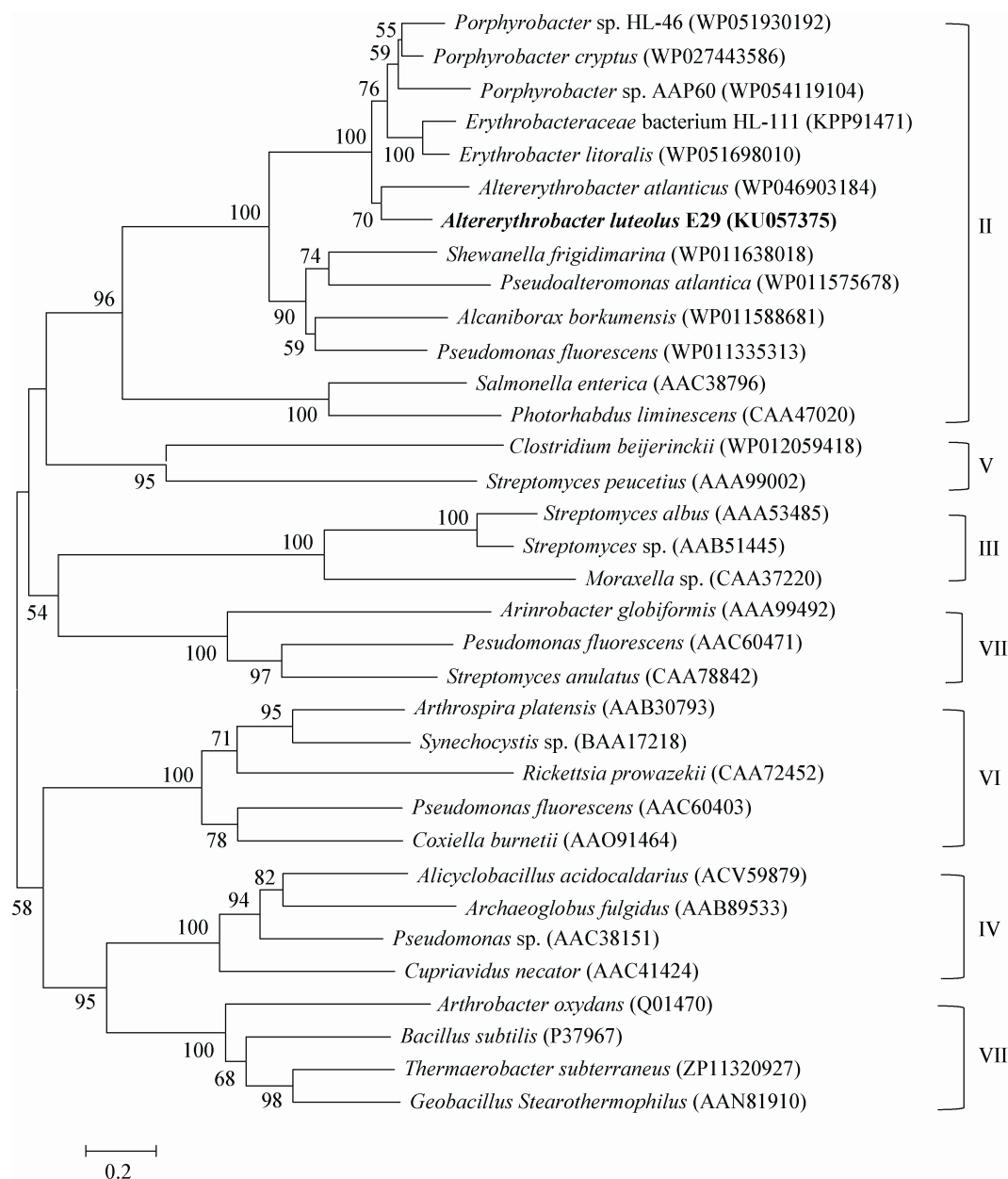


图 1 E29 与其他脂类水解酶的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of E29 and other lipolytic enzymes

注：括号内数字为 GenBank 登录号；罗马数字代表分支上的蛋白所属的家族。

Note: The numbers in the bracket denote the GenBank accession number; and the Roman numbers represent family of lipolytic enzyme which proteins on the branch belong to.

在一些金属阳离子存在的条件下，酯酶 E29 能保持良好的酶学活性，特别是在 Sr^{2+} 存在时，酶活力值有提高，在 10 mmol/L Ni^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 存在情况下酶活力值几乎保持不变；然而 10 mmol/L 的 Co^{2+} 和 Mn^{2+} 则会强烈地抑制酶活力值

(图 7)。酯酶 E29 能耐受 1% 的 Triton X-100；在 1% SDS 存在情况下，酶完全失活；15% 的异丙醇或乙醇能强烈抑制酶活力值；在甘油存在的情况下，酶活力值有一定幅度提高(图 8)。

酯酶 E29 与其他酯酶的酶学性质比较见表 2、3。

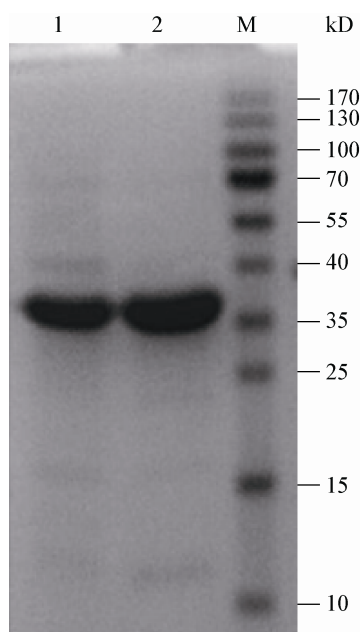


图2 重组蛋白 sumo-E29 的 SDS-PAGE 图

Figure 2 SDS-PAGE of recombinant sumo-E29

注：1：150 mmol/L 咪唑溶液洗脱的流出液；2：250 mmol/L 咪唑溶液洗脱的流出液；M：标准分子量蛋白 Marker。

Note: 1: Elution of 150 mmol/L imidazole; 2: Elution of 250 mmol/L imidazole; M: Marker.

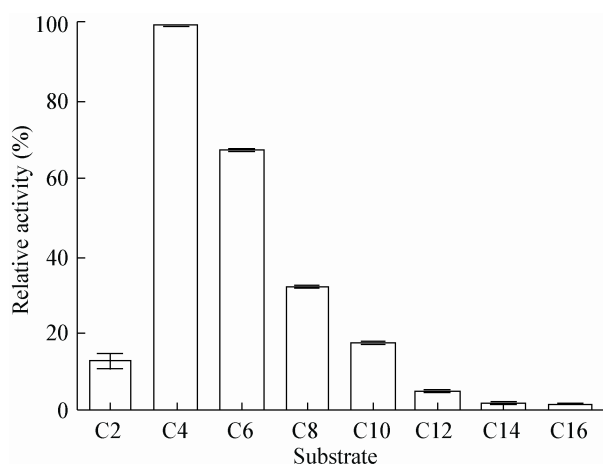


图3 酯酶 E29 底物特异性结果图

Figure 3 Substrate specificity of E29

注：在 45 °C 和 pH 8.5 的条件下测定酶活力值，酯酶 E29 对对硝基苯酚丁酸酯(C4)的酶活为 100%。

Note: The esterase activity of the purified recombinant enzyme E29 towards various chain lengths of p-NP esters was assayed at 45 °C and pH 8.5. The highest level of activity with the C4 substrate was taken as 100%.

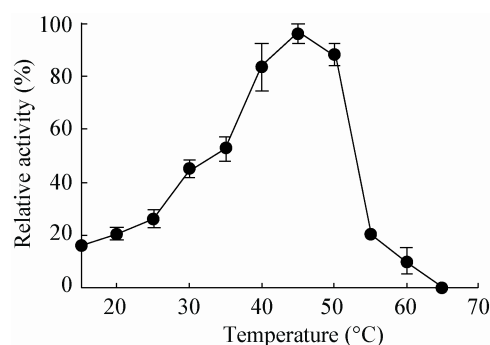


图4 温度对 E29 催化活性的影响

Figure 4 The activity of E29 under different temperatures

注：以对硝基苯酚丁酸酯为底物，在 pH 8.5 的条件下测定不同温度下的酶活力值，将 45 °C 下测得的酶活作为 100%。

Note: Enzyme activity was determined with a series of temperatures at pH 8.5 using *p*-nitrophenol butyrate as substrate. The value obtained at 45 °C was defined as 100%.

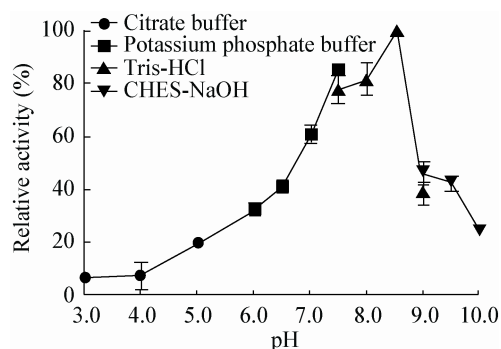


图5 pH 对 E29 催化活性的影响

Figure 5 The activity of E29 at different pH

注：以对硝基苯酚丁酸酯为底物，45 °C 条件下测不同 pH 条件下的酶活力值。

Note: The activity was determined using *p*-nitrophenol butyrate as substrate. The assay was performed under 45 °C.

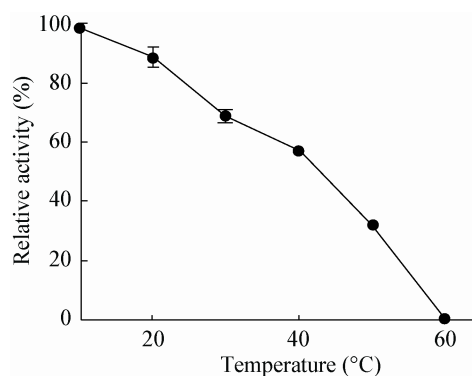


图6 E29 的热稳定性研究

Figure 6 Thermostability of recombinant E29

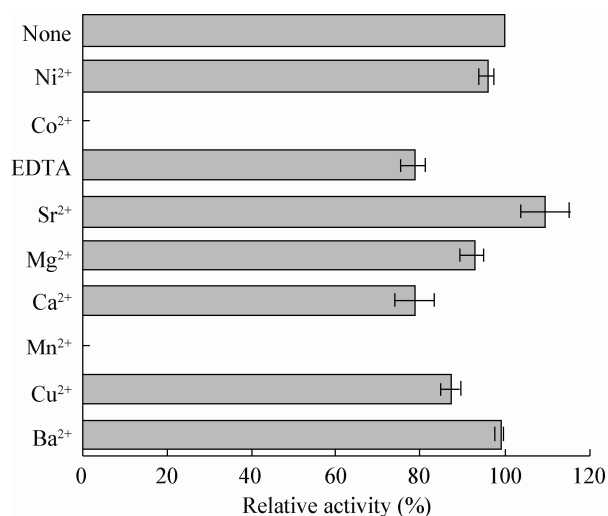


图7 二价阳离子对 E29 催化活性的影响

Figure 7 Effect of metal ions on activity of recombinant E29

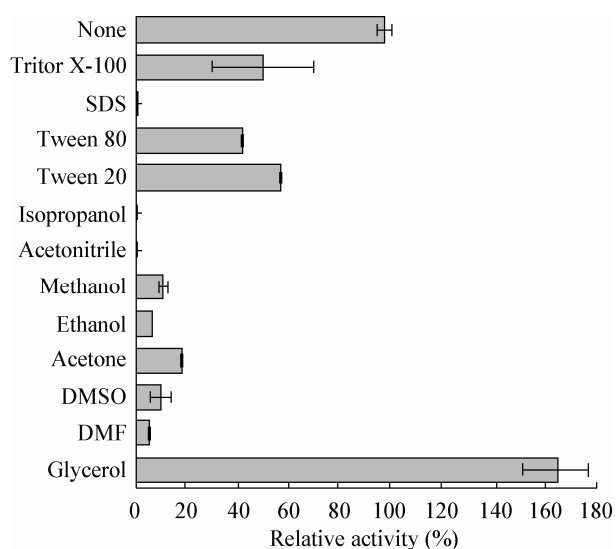


图8 去垢剂及有机溶剂对 E29 催化活性的影响

Figure 8 Effect of detergents and organic solvents on activity of recombinant E29

3 结论与讨论

海洋是一个巨大的微生物资源宝库, 蕴含着大量的类型多样、功能未知的新型酶。近年来, 关于海洋微生物新型功能基因的分离与鉴定越来越受到人们的重视。传统的新型酶筛选方法主要依据目标酶的活性而开展。近年来, 微生物基因组测序越

来越普遍, 基于基因组序列直接寻找新型酶编码基因已成为筛选工业催化剂的一种有效途径, 这种分析方法可称为 *in silico* 分析。以往通过 *in silico* 分析已发现具有特殊性质的新型酯酶, 甚至脂类水解酶新家族^[19-20]。酯酶 *e29* 基因也是通过该技术发现的, 并由此开展了后续酶学性质研究。

本研究以来源于 *Aba. luteolus* SW109^T 的新型酯酶 E29 为对象, 通过克隆和异源表达方法获得了可溶性表达产物, 进一步采用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 获得了重组酯酶 E29。序列分析和比对结果显示, 酯酶 E29 属于脂类水解酶的第二家族。脂类水解酶第二家族又称为 GDSL 家族, 该家族蛋白的氨基酸序列中存在一个特有的 GDSL 序列^[1], 并且比其他家族的蛋白 GX SXG 五肽序列更靠近肽链的 N 端^[21]。作为脂类水解酶第二家族的新成员, 酯酶 E29 的氨基酸序列 N 端第 11–14 个氨基酸残基组成了一个 GDSL 序列, 第 13 位的丝氨酸是其催化活性三角的组成部分, 参与了酯类水解反应。

通过酶底物特异性分析发现, 酯酶 E29 在降解短链对硝基苯酚酯时具有良好的酶活力值, 在对硝基苯酚十四酸酯和对硝基苯酚十六酸酯存在的情况下, 也表现出一定的降解能力, 显示了 E29 具有较宽的底物谱, 这在其他已知酯酶中并不常见(表 2, 表 3)。酯酶 E29 最适反应底物是对硝基苯酚丁酸酯, 在降解过程中酶活力值可达 150.12 ± 2.60 U/mg, 较多数已分离的酯酶以同样方法测得的酶活高(表 2, 表 3)。酯酶 E29 的最适催化温度为 45 °C, 最适催化 pH 为 8.5, 在温度较低(15、20 °C)情况下也具有一定的酶活, 这可能与该酶来源于海洋环境有关。酯酶 E29 具有良好的热稳定性, 在 40 °C 保温 1 h 情况下仍然具有 60 % 以上的活性, 这在海洋来源的酯酶中并不常见(表 3); 其对部分金属离子、去垢剂和有机溶剂具有良好的耐受性, 增加了其使用范围的广泛性。综上所述, 酯酶 E29 是一个较好的工业应用候选酶, 还可为以后工业应用酶的改造提供模板及借鉴。

表 2 E29 及其他 GDSE 家族酯酶学性质比较 Table 2 Comparison of E29 with other esterases belong to GDSE family							
酯酶名称 Name of esterase	菌株来源 Source of strain	酶活力 Activity (U/mg)	最适底物 Optimal substrate	底物谱 Substrate range	最适温度 Optimal temperature (°C)	最适反应 pH Optimal pH	40 °C 下保温 1 h 剩余活性率 Remaining activity under 40 °C for 1 h (%)
E29	<i>Aba. luteolus</i>	150.12±2.60	C4	C2-C16	45	8.5	60
AcAlgE ^[22]	<i>Sphingomonas</i> sp. MJ-3	—	C2	—	22	6.5	—
EstL5 ^{#[23]}	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	33.2	C4	C2-C8	60	8.0	80
EstHE1 ^[24]	Unidentified bacteria	5.6	C2	C2-C6	40	7.4	80

注：#：酯酶来源于土壤。

Note：#：Esterase isolated from soil.

表 3 E29 及其他海洋来源酯酶学性质比较								
Table 3 Comparison of E29 with other esterases from marine environment								
酯酶名称	菌株来源	家族	酶活力	最适底物	底物谱	最适温度	最适反应 pH	40 °C 下保温 1 h 剩余活性率
Name of esterase	Source of strain	Family	Activity (U/mg)	Optimal substrate	Substrate range	Optimal temperature (°C)	Optimal pH	Remaining activity under 40 °C for 1 h (%)
E29	<i>Aba. luteolus</i>	II	150.12±2.60	C4	C2–C16	45	8.5	60
Est6 ^[25]	Metagenome	IV	104.41	C4	C2–C12	20	7.5	<10
scsEst01 ^[26]	Metagenome	IV	171.03	C4	–	35	8.0	<10
EstL28 ^[27]	Metagenome	V	25.59±2.55	C4	C2–C10	35	8.5	<10
rYli180 ^[28]	<i>Yarrowia lipolytica</i>	VI	100	C4	C2–C10	35	7.5	<10
FLS2 ^[29]	Metagenome	VII	2.3±0.4	C4	–	50	–	–

注：海洋环境中的酯酶大多数(66.7%^[29])属于脂类水解酶的第四家族，其他的主要为第二、五和七家族。

Note: Most esterases from marine environment belong to Family IV (66.7%^[29]), the remainders mainly belong to Family II, Family V and Family VII.

参 考 文 献

- [1] Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, et al. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(6): 534-552
- [2] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis[J]. FEMS Microbiology Reviews 2002, 26(1): 73-81
- [3] Taylor SJC, Brown RC, Keene PA, et al. Novel screening methods—the key to cloning commercially successful biocatalysts[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1999, 7(10): 2163-2168
- [4] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. Biochemical Journal, 1999, 343(1): 177-183
- [5] Al Khudary R, Venkatachalam R, Katzer M, et al. A cold-adapted esterase of a novel marine isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: gene cloning, enzyme purification and characterization[J]. Extremophiles, 2010, 14(3): 273-285
- [6] Hess M, Katzer M, Antranikian G. Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*[J]. Extremophiles, 2008, 12(3): 351-364
- [7] Rao L, Zhao XB, Pan F, et al. Solution behavior and activity of a halophilic esterase under high salt concentration[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e6980
- [8] Kwon KK, Woo JH, Yang SH, et al. *Altererythrobacter epoxidivorans* gen. nov., sp. nov., an epoxide hydrolase-active, mesophilic marine bacterium isolated from cold-seep sediment, and reclassification of *Erythrobacter luteolus* Yoon et al. 2005 as *Altererythrobacter luteolus* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(Pt 10): 2207-2211
- [9] Yoon JH, Kang KH, Yeo SH, et al. *Erythrobacter luteolus* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(Pt 3): 1167-1170
- [10] Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 75.
- [11] Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, et al. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kD antigen from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(14): 3547-3554
- [12] Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry[J]. Nature, 2008, 456(7218): 53-59
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [14] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [15] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [16] Huggins C, Lapidus J. Chromogenic substrates: IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase[J]. Journal of Biological Chemistry, 1947, 170(2): 467-482
- [17] Lexow U, Ronai A, von Deimling O. Purification and characterization of esterase 2B of the house mouse, *Mus musculus*[J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 107(1): 123-130
- [18] Swift ML. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing[J]. Journal of Chemical Information and Modeling, 1997, 37(2): 411-412
- [19] Kim HK, Jung YJ, Choi WC, et al. Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 235(2): 349-355
- [20] de Pascale D, Cusano AM, Autore F, et al. The cold-active Lip1 lipase from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 is a member of a new bacterial lipolytic enzyme family[J]. Extremophiles, 2008, 12(3): 311-323
- [21] Upton C, Buckley JT. A new family of lipolytic enzymes[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1995, 20(5): 178-179
- [22] Park YJ, Chu YJ, Shin Y H, et al. Molecular cloning and characterization of a novel acetylglutamate esterase gene in *alg* operon from *Sphingomonas* sp. MJ-3[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(5): 2145-2154
- [23] Yang ZX, Zhang Y, Shen TT, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 115(2): 133-137
- [24] Okamura Y, Kimura T, Yokouchi H, et al. Isolation and characterization of a GDSL esterase from the metagenome of a marine sponge-associated bacteria[J]. Marine Biotechnology, 2010, 12(4): 395-402
- [25] Jiang XW, Xu XW, Huo YY, et al. Identification and characterization of novel esterases from a deep-sea sediment metagenome[J]. Archives of Microbiology, 2012, 194(3): 207-214
- [26] Zhang H, Li FC, Chen HX, et al. Cloning, expression and characterization of a novel esterase from a South China Sea sediment metagenome[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2015, 33(4): 819-827
- [27] Seo S, Lee YS, Yoon SH, et al. Characterization of a novel cold-active esterase isolated from swamp sediment metagenome[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(3): 879-886
- [28] Kim JT, Kang SG, Woo JH, et al. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(4): 820-828
- [29] Hu YF, Fu CZ, Huang YP, et al. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 72(2): 228-237