

来源于海洋细菌 *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 的新型碱性酯酶 E22 的酶学性质

戎振 霍颖异 徐曹狄 简书令 王春生 许学伟*

(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)

摘要:【目的】克隆表达海洋细菌 *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 中的酯酶基因 *e22*, 并研究其酶学性质。【方法】分析菌株的全基因组序列, 筛选获得一个酯酶基因 *e22*, 将其克隆至 pET-28a 载体上, 并转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞中表达, 研究纯化后表达产物的酶学性质。【结果】通过氨基酸序列分析, 确定酯酶 E22 属于脂类水解酶第二家族(Family II)。酶学性质研究结果表明, 该酶最适反应底物为对硝基苯酚丁酸酯(C4); 最适反应 pH 10.5, 为碱性酯酶; 最适反应温度为 55 °C, 并在 60 °C 孵育 2 h 后仍保留超过 50% 的活性, 显示了良好的热稳定性; 1% 甲醇、1% Triton X-100 或 0.1% SDS 对酯酶 E22 的活性无显著影响, 而 10 mmol/L 的 Ba²⁺ 或 Ca²⁺ 则对其活性有抑制作用。【结论】E22 是一个新型海洋来源酯酶, 具有耐碱性、热稳定性、有机溶剂和去垢剂耐受性等优良特性, 在工业生产中具有较好的应用潜力。

关键词: 海洋细菌, 碱性酯酶, 酶学性质, 克隆表达

Characterization of a novel alkaline esterase (E22) from a marine bacterium *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T

RONG Zhen HUO Ying-Yi XU Cao-Di JIAN Shu-Ling WANG Chun-Sheng
XU Xue-Wei*

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

Abstract: [Objective] To clone and express an esterase gene *e22* from marine bacterium *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T and characterize the enzyme. [Methods] Screening of the genome of strain CGMCC 1.7731^T obtained an esterase-encoding gene, *e22*. The gene was amplified by PCR and cloned into the expression vector pET-28a. Then, the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for heterogenetic expression. After purified by affinity chromatography, the enzyme was characterized. [Results] The amino acids sequence analysis indicated

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 41506183)

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

Received: February 28, 2017; **Accepted:** May 31, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 41506183)

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

收稿日期: 2017-02-28; **接受日期:** 2017-05-31; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-06-06

E22 belongs to Family II of lipolytic enzyme. The enzymatic property assay revealed that E22 had maximum activity using *p*-nitrophenyl butyrate as substrate. It was an alkaline esterase that had highest activity at pH 10.5. The optimal reaction temperature was 55 °C. After incubated at 60 °C for 2 h, E22 still remained over 50% activity, which showed its moderate thermal stability. The activity of E22 was not significantly affected by the presence of 1% methanol, 1% Triton X-100 or 0.1% SDS. On the contrary, the addition of 10 mmol/L Ba²⁺ and Ca²⁺ would apparently inhibit the catalytic capacity of E22. **[Conclusion]** E22 is a novel marine esterase with excellent properties such as thermostability, and alkaline, organic solvent and detergent tolerance. These characteristics suggest its application prospects in the industrial production.

Keywords: Marine bacterium, Alkaline esterase, Characterization, Cloning and expression

广义上的酯酶(EC 3.1.1.X)是指能催化酯键水解和形成的酶类, 又称脂类水解酶; 狭义的酯酶(EC 3.1.1.2)是指可催化水解短链酰基甘油的酶类^[1]。通过对数据库中微生物来源的脂类水解酶氨基酸序列和催化作用特点的分析, Arpigny 和 Jaeger 将脂类水解酶分为 8 个家族, 不同家族通常有其独特的保守基序。作为一种 α/β 水解酶, 酯酶通常具有由丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸 3 个氨基酸残基组成的催化三联体, 在催化酯键断裂或还原的反应中作为活性中心^[2]。酯酶因其较广的底物谱、良好的有机溶剂耐受性和独特的手性选择性等特点而广泛应用于食品、纺织、制药以及化妆品等工业生产领域^[3]。为了适应生产过程中的一些相对极端条件, 例如高温、高盐、极酸、极碱或高浓度有机溶剂, 寻找能够适应极端条件的新型酯酶已成为研究热点之一^[4]。

酯酶存在于绝大多数生物体内, 而目前作为工业催化剂的酯酶多分离于真菌或细菌^[3,5], 这不仅是因为微生物来源酯酶具有产量高、成本低和操作简便等优点^[6], 更重要的是, 从适应极端条件的微生物中更容易获得具有独特性质的酯酶。海洋是一个天然的微生物资源宝库, 海洋来源的酯酶通常具有与海洋环境相关的优良性质, 例如温度稳定性、耐盐性、耐碱性、耐低温、以及优异的手性选择性等^[7], 从海洋微生物中筛选具有独特性质的酯酶已成为开发新型工业用酶的一个重要方向。随着研究深入, 越来越多海洋来源的酯酶被人们发现^[8-10]。

本研究通过对海洋来源菌株 *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 的全基因组序列分析^[11], 筛选出一个假定的酯酶基因 *e22*。以 pET-28a 为载体将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中异源表达, 纯化并研究重组酶的底物特异性、最适反应条件、热稳定性、变性剂和有机溶剂耐受等酶学性质。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

菌株 *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 分离自日本鹿儿岛海湾冷泉区沉积物^[12], 购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。质粒 pET-28a、菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)和 *E. coli* DH5 α 为本实验室保藏。海洋培养基 2216^[13]用于培养菌株 *A. epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T, LB 培养基用于培养 *E. coli*^[14]。

1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶, New England Biolabs 公司(NEB); Prime STAR GXL DNA 聚合酶, 宝生物工程有限公司(TaKaRa); 分子克隆所需试剂盒, OMEGA 公司; 对硝基苯酚酯、对硝基苯酚标准溶液, Sigma-Aldrich 公司; 亲和层析柱及填料, 美国 GE Healthcare 公司; 其他相关色谱级或分析级试剂, 生工生物工程(上海)股份有限公司。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; 超声波细胞破碎仪(650Y), 上海比朗仪器制造有限公司; 核酸蛋白分析仪(DU800), 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司。

1.3 序列分析

筛选菌株 *A. epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 全基因组注释结果^[11], 获得一个假定的酯酶基因 *e22*。使用 BLASTp 程序(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)将其氨基酸序列与同源酯酶序列进行比对分析。相对分子质量和等电点(Isoelectric point, pI)通过 ExPASy 数据库(<http://www.expasy.org/proteomics>)预测。信号肽采用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)预测。多序列比对分析后, 采用 MEGA 7.0^[15]基于 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树。

1.4 克隆与表达

以 *A. epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增目的基因。PCR 体系(50 μ L): DNA 模板 1 μ L; Prime STAR GXL DNA 聚合酶 2 μ L; 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L; 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L; 5 \times Prime STAR GXL Buffer 10 μ L; ddH₂O 31 μ L。PCR 扩增条件: 98 $^{\circ}$ C 10 min; 98 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 35 s, 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。引物序列为: 上游引物 5'-TCGCGAGCTCATGGCTGTTGGCAGCTGGTCG-3' 和下游引物 5'-TCCGGCGGCCGCTCAATCGAGCGCTTC-3', 其中限制酶切位点 *Sac* I 和 *Not* I 分别由下划线标出。将扩增获得的目的基因与质粒 pET-28a 同时用 *Sac* I 和 *Not* I 限制酶消化后连接, 得到的重组质粒 pET-28a-*e22* 转化入 *E. coli* DH5 α 细胞并扩增, 提取质粒并测序验证是否为正确克隆。序列验证后, 将重组质粒转化入 *E. coli* BL21(DE3)细胞中培养表达。待培养液 OD₆₀₀ 达到 0.6–0.8, 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 16 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 20 h。4 $^{\circ}$ C、5 000 \times g 离心 15 min 收集细胞。

1.5 酯酶纯化

收集的菌体采用 Buffer A (500 mmol/L 氯化钠, 10 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)重悬, 并采用超声波破胞。破胞液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 高速离心 20 min 后, 通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白。纯化过程为: 采用 Buffer A 平衡亲和层析柱后, 将离心后的上清液加入层析柱与 Ni 介质结合, 再采用 Buffer B (500 mmol/L 氯化钠, 50 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)和 Buffer C (500 mmol/L 氯化钠, 250 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)依次洗脱蛋白。使用浓度为 12.5%的 SDS-PAGE 检测洗脱液中蛋白量及纯度, 并用 Bradford^[16]方法测定蛋白浓度。

1.6 酶活性质研究

酯酶催化水解对硝基苯酚酯生成对硝基苯酚, 采用核酸蛋白分析仪(Beckman DU800)测定 2 min 内生成的对硝基苯酚数值, 根据其在一定波长下的吸光值变化计算酯酶活力值。反应的标准体系为: 10 μ L 0.1 mol/L 对硝基苯酚丁酸酯, 980 μ L 100 mmol/L Ches-NaOH 缓冲液(pH 9.5)和 10 μ L 纯化后的酶液, 总体系为 1 mL; 反应温度为 35 $^{\circ}$ C, 测量光波长为 405 nm^[17](若无另外说明, 反应均在此波长和温度下测量)。每次测量设置 3 个平行实验组, 并以加入灭活酶的体系作为对照组。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 对硝基苯酚需要的酶量。用 100 mmol/L Ches-NaOH 缓冲液(pH 9.5)配置对硝基苯酚标准品 0.01–0.1 mmol 的浓度梯度, 分别测量其在 35 $^{\circ}$ C 及 405 nm 波长下的吸光值, 绘制标准曲线并计算得到对硝基苯酚的消光系数为 14.1 L/(mmol \cdot cm)^[18]。数据处理及图形绘制利用软件 GraphPad Prism 6^[19]完成。

1.6.1 底物特异性: 在 55 $^{\circ}$ C 和 pH 10.5 条件下, 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, 具体包括: 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 pH: 在 35 °C 条件下(避免高温对不同缓冲液 pH 值的影响)连续测定不同 pH 条件 348 nm 波长(对硝基苯酚非 pH 依赖的等吸光点)^[17] 的吸光值。所用缓冲液包括: 100 mmol/L 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液(pH 7.0–7.5)、100 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.5–9.0)和 100 mmol/L Ches-NaOH 缓冲液(pH 9.0–10.5)。

1.6.3 最适反应温度与热稳定性: 分别将标准体系置于不同温度(15–60 °C, 间隔 5 °C)下反应, 连续测定其吸光值。将纯化后的酶液分别置于 40、50 和 60 °C 孵育 1 h 和 2 h, 在最适反应温度 55 °C 条件下分别测定剩余活性。

1.6.4 金属离子及 EDTA 耐受性: 为认识不同金属离子对酶的活力影响, 在标准反应体系中分别加入 10 mmol/L 的 Sr²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺或乙二胺四乙酸(EDTA)^[20], 测定酶活力。对照组为不加金属离子的标准反应体系。

1.6.5 有机溶剂及去垢剂耐受性: 为认识不同有机溶剂及去垢剂对酶的活力影响, 在标准反应体系中分别加入 1%的异丙醇(Isopropanol)、乙腈(Acetonitrile)、甲醇(Methanol)、乙醇(Ethanol)、丙酮(Acetone)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、二甲基甲酰胺(Dimethyl formamide, DMF)或甘油(Glycerol)等有机溶剂, 0.1%的十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)或 1%的聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)、吐温-20 (Tween-20)或吐温-80 (Tween-80)等去垢剂, 测定酶活力。对照组为不加有机溶剂及去垢剂的标准反应体系。

1.7 核苷酸序列登录号

A. epoxidivorans CGMCC 1.7731^T 的酯酶基因 *e22* 核苷酸序列的 GenBank 登录号为 WP 061923136 中的 Locus_tag AMC99_00842, 其氨基酸序列登录号为 ALE16145。

2 结果与分析

2.1 序列分析

通过对 *A. epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 基

因组注释, 筛选获得的 *e22* 基因, 其为一个 693 bp 的开放阅读框, 编码 230 个氨基酸, 预测 E22 其相对分子质量为 25 kD, pI 为 4.26。SignalP 4.1 Server 分析结果显示, E22 具有一个信号肽, 切割位点位于序列中的 17 和 18 位, 期望值为 0.579。通过 NCBI 上 BLASTp 比对, 结果显示 E22 的氨基酸序列与来自菌株 *Erythrobacter* sp. AP23 的假定酯酶 Arylesterase (WP 067695227) 序列一致性最高, 达到 64%。将 E22 与不同家族酯酶的氨基酸序列进行比对后构建系统发育树, 结果显示 E22 属于酯酶第二家族(Family II) (图 1), ClustalW 比对结果表明, 它们具有相同的代表第二家族酯酶特征的 GDSL 基序(E22 的 145–148 位氨基酸)^[2]。

2.2 酯酶 E22 的表达与纯化

酯酶基因 *e22* 与 pET-28a 连接后, 重组质粒转化入 *E. coli* DH5 α 扩增并验证测序。而后将重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达, 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 结果显示, 重组蛋白 E22 的相对分子质量约为 25 kD, 与预测相符, 如图 2 所示。

2.3 酯酶 E22 的酶学性质表征

选用不同侧链长度的对硝基苯酚酯(C2–C16)作为底物, 分析酯酶 E22 的底物特异性, 结果如图 3 所示。酯酶 E22 主要对短链底物如对硝基苯酚丁酸酯(C4)具有显著催化水解作用, 其水解反应活性最强(酶活力值为 25 U/mg), 约为 C6 作底物时的 10 倍。E22 对短链底物具有的高水解能力表明其是一个酯酶而不是脂肪酶^[1]。

图 4 显示 E22 是一个碱性酯酶, 在 pH 为 10.5 的情况下酶活力依然在增长。选用了 Britton-Robinson 缓冲液^[21]测定 pH 11.0、11.5 和 12.0 条件下的酶活力, 但由于底物在高 pH 条件下底物对硝基苯酚丁酸酯自降解速度快导致无法测量光吸收值。因此在可测定的 pH 范围内, E22 在 pH 10.5 条件下具有最高水解活性。

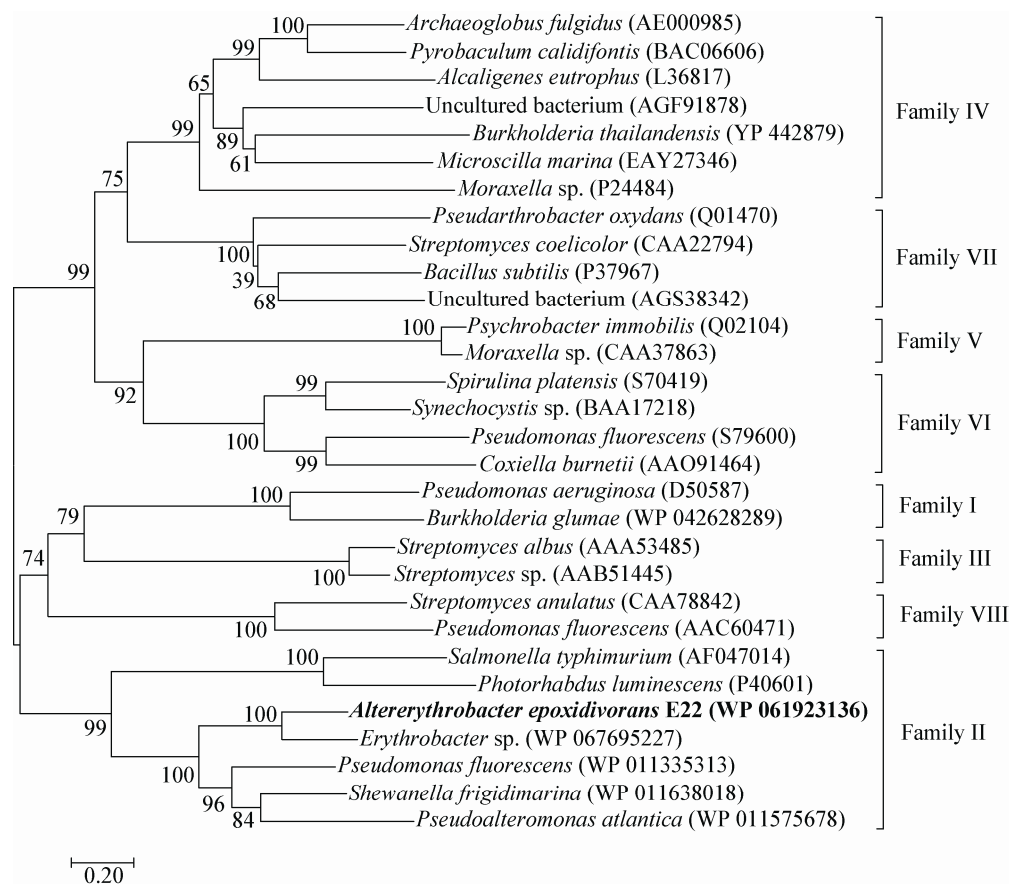


图 1 E22 与其他脂类水解酶的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of E22 and other lipolytic enzymes

注：括号内数字为 GenBank 登录号；各个分支处数值表示基于 1 000 次重复取样的 Bootstrap 支持率；标尺表示氨基酸替换率；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; bootstrap values are based on 1 000 replicates; bar scale indicates 0.20 amino acid substitutions per site; and the numbers represent family of lipolytic enzyme which proteins on the branch belong to.

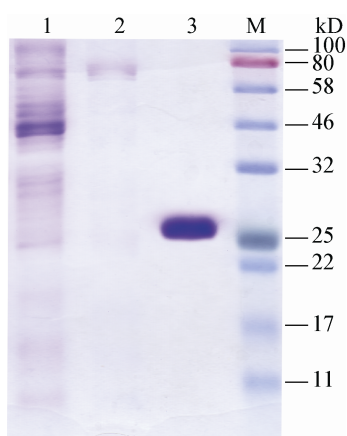


图 2 酯酶 E22 的 SDS-PAGE 图

Figure 2 SDS-PAGE of E22

注：1-3：10、50 或 250 mmol/L 咪唑溶液洗脱的流出液；M：标准分子量蛋白 Marker。

Note: 1-3: Elution of 10, 50 or 250 mmol/L imidazole; M: Marker.

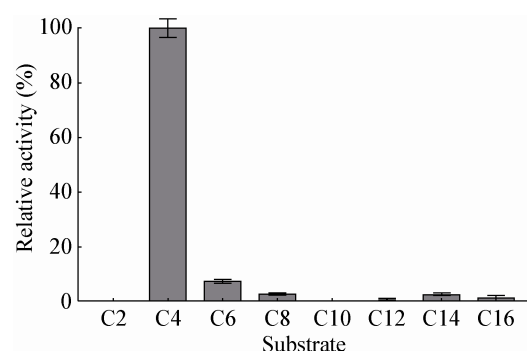


图 3 酯酶 E22 的底物特异性

Figure 3 Substrate specificity of E22

注：在 55 °C 和 pH 10.5 条件下测定酶活力值，以对硝基苯酚丁酸酯(C4)为底物时酶活为 100%。

Note: The esterase activity of the purified recombinant enzyme E22 towards various chain lengths of *p*-NP esters was assayed at 55 °C and pH 10.5. The highest level of activity with *p*-nitrophenol butyrate was taken as 100%.

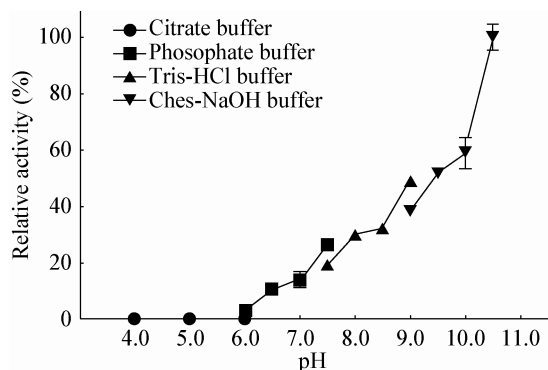


图4 pH 对 E22 活性的影响

Figure 4 Effect of different pH on the activity of E22

注: 以对硝基苯酚丁酸酯为底物, 35 °C 条件下测定不同 pH 时的酶活力值。

Note: The activity was determined using *p*-nitrophenol butyrate as substrate. The assay was performed under 35 °C.

最适反应温度的实验结果如图 5 所示, E22 在 15–60 °C 范围内均有酶活, 且在 55 °C 条件下发挥最高水解活性。热稳定性的实验结果表明, 在 40–60 °C 条件下孵育 1 h 对 E22 酶活力影响不大, 仍具有 80% 以上的酶活力; 30 °C 和 40 °C 孵育 2 h 后酶活力仍具有 80% 以上, 60 °C 孵育 2 h 后具有 45% 的酶活力, 说明酯酶 E22 具有良好的热稳定性(图 6)。

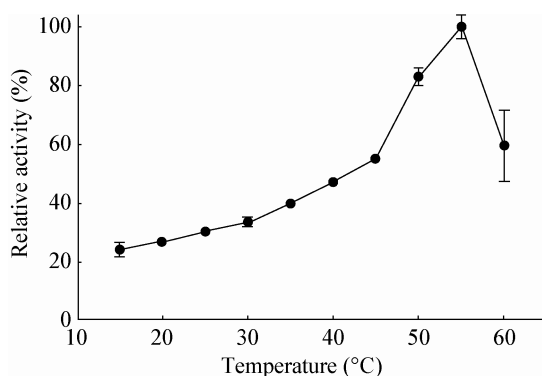


图5 温度对 E22 活性的影响

Figure 5 The activity of E22 under different temperatures

注: 以对硝基苯酚丁酸酯为底物, 在标准条件下测定不同温度下的酶活力值, 将 55 °C 条件下测得的酶活作为 100%。

Note: Enzyme activity was determined with a series of temperatures at pH 9.5 using *p*-nitrophenol butyrate as substrate. The value obtained at 55 °C was defined as 100%.

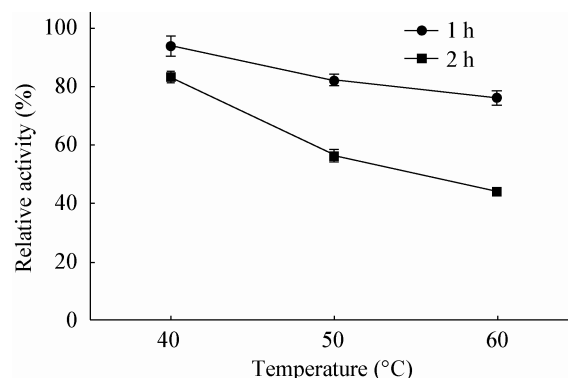


图6 E22 的热稳定性研究

Figure 6 Thermostability of E22

二价金属阳离子的加入对 E22 的酶活力有不同程度的抑制作用(图 7)。相比而言, Mg^{2+} 和 Sr^{2+} 对酯酶活性的影响较小, E22 能够保留 78% 以上的活力; Ba^{2+} 强烈抑制 E22 的催化水解能力, 仅保留 34% 左右的酶活力。有机溶剂耐受性实验中(图 8), 加入异丙醇后底物水解反应速度快, 导致无法准确测量数值, 其他有机溶剂的测量过程均正常, 其中仅乙腈、二甲基甲酰胺和甘油对 E22 有轻微的抑制作用, 丙酮、乙醇和二甲基亚砜对酶活力无影响, 而甲醇将 E22 活性提高了 30% 以上。去垢剂影响实验中(图 8), 0.1% 的 SDS 和 1% 的 Triton X-100 可显著提高酶活力值。结果表明, E22 具有较好的有机溶剂及去垢剂耐受性。

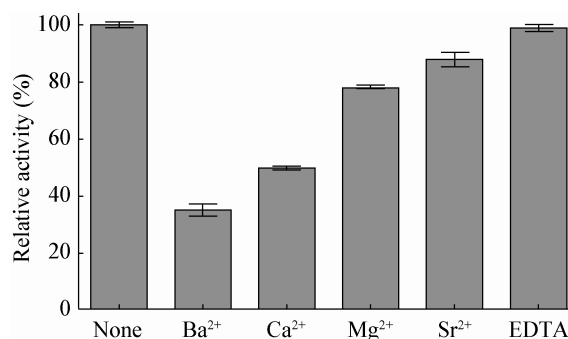


图7 二价金属阳离子和 EDTA 对 E22 活性的影响

Figure 7 Effect of metal ions and EDTA on activity of E22

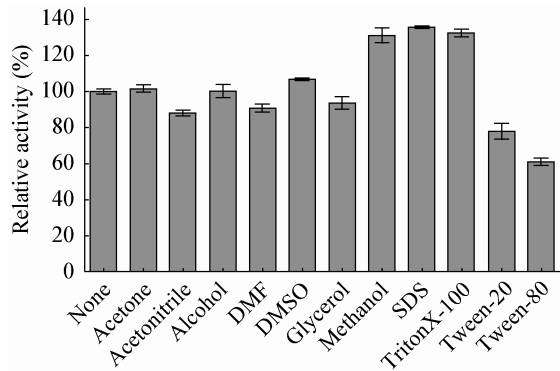


图8 有机溶剂及去垢剂对 E22 活性的影响
Figure 8 Effect of detergents and organic solvents on activity of recombinant E22

3 讨论

近年来,围绕新型酯酶的研究工作取得了长足进步,以海洋微生物为研究对象,研究者们从中筛选出了许多性质各异的酯酶^[22-24]。尤其是海洋中一些极端环境促进了生物的某些定向进化,使得孕育其中的微生物往往能够表达具有极端性质的酯酶^[24-25]。以海洋极端环境中的微生物作为研究对象已成为获取新型酯酶重要方向之一。

在本研究中,我们以分离自海底沉积物的赤杆菌科菌株 *A. epoxidivorans* CGMCC 1.7731^T 为研究对象,克隆表达了一个新型酯酶基因 *e22*,并研究了其酶学性质。氨基酸序列分析结果表明, E22 属于脂类水解酶第二家族,该家族酯酶的催化机制与其他家族相比较为独特,其活性位点在与不同底物的结合时可以改变构象,具有较高灵活性,这使得

不同的底物能以最佳构象与酶结合进行催化水解反应^[2]。这一特性对于理解具有多重底物或多功能特性的酶催化原理具有重要意义。酶学性质的鉴定结果表明,酯酶 E22 具有一些优良特性。首先,催化反应最适 pH 实验结果表明, E22 是一种新型碱性酯酶,其对碱性的偏好在同源的 Family II 酯酶中并不常见(表 1)。将 E22 与近年来已公布的海洋来源碱性酯酶相比(表 2),它具有较高的催化反应最适 pH 值。E22 在耐碱性方面的独特性质,使其在碱性条件下的相关催化过程中具有应用潜力^[36]。其次,海底低温的生长环境通常会造成酶能适应低温环境^[37],但仍有些酶的最适温度较高且热稳定性差^[38];来源于海底冷泉区沉积物的 E22 具有较高的催化反应最适温度(55 °C)和良好的热稳定性(60 °C 孵育 2 h 后检测到 51%剩余活性),将其与同为海底沉积物来源的 Est_p1^[31]、EstF^[32]、EM2L8^[33]、Est12^[34]以及 Est4^[35]相比,结果显示 E22 在热稳定性方面具有较大优势。第三, E22 具有良好的有机溶剂及去垢剂耐受性。实际工业生产中,酯酶催化酯键水解、合成或交换反应常在非纯水性环境中进行,酶在有机溶剂存在下的高失活率限制了其在工业生产中的应用^[39]。有机溶剂影响实验表明,在一些有机溶剂(1%)存在情况下 E22 酶活力不受或仅受轻微影响,甚至部分有机溶剂能够促进其酶活力提高。此外, E22 还表现出耐受去垢剂 SDS 和 Triton X-100 的能力,这也增加了它在未来工业应用中的潜力。

表1 E22 与其他 Family II 酯酶的酶学性质比较

Table 1 Comparison of the enzymatic properties of E22 with other esterases of Family II

名称 Name	菌株来源 Resource of strain	最适底物 Optimal substrate	底物谱 Substrate range	最适温度 Optimal temperature (°C)	最适 pH Optimal pH	60 °C 孵育 2 h 剩余活性 Residual activity after incubated for 2 h (%)
E22	<i>A. epoxidivorans</i>	C4	C4-C16	55	10.5	46
EstSL3 ^[26]	<i>Alkalibacterium</i> sp. SL3	C2	C2-C6	30	9.0	<10
EstS9N ^[27]	<i>Pseudomonas</i> sp. S9	C4	C2-C8	35	9.0	95-100
EstL5 ^[28]	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> T2	C4	C2-C8	60	8.0	75-80
EstHE ₁ ^[29]	Unidentified bacterium	C2	C2-C6	40	7.4	80
EstA ^[30]	<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C4	C2-C6	NR	7.0	NR

注: 酯酶剩余活性均在最适条件下测定; NR: 文献中缺少相关资料。

Note: Residual activity of esterases were measured under optimal conditions; NR: Not record in the literature.

表 2 E22 与其他耐碱酯酶的酶学性质比较
Table 2 Comparison of the enzymatic properties of E22 with other alkaline esterases

名称 Name	菌株来源 Resource of strain	最适底物 Optimal substrate	最适温度 Optimal temperature (°C)	最适 pH Optimal pH	热稳定性 Thermostability			
					孵育温度 Incubation temperature (°C)	孵育时间 Incubation time (h)	反应条件 Reaction condition	剩余活性 Residual activity (%)
E22	<i>A. epoxidivorans</i>	C4	55	10.5	40	2	55 °C	88
					60	2	pH 10.5	46
RhLip ^[24]	<i>Rhodococcus</i> sp.	C4	30	11.0	50	2	30 °C	20
Est_p1 ^[31]	Marine sediment metagenome	C4	40	8.57	40	2	pH 10.0	<40
EstF ^[32]	Marine sediment metagenome	C4	50	9.0	40	1	40 °C	85–90
					60	1	pH 8.0	0
EM2L8 ^[33]	Marine sediment metagenome	C4	50	10.0	NR	NR	NR	NR
Est12 ^[34]	Marine sediment metagenome	C6	50	9.0	40	1	40 °C	85–90
					60	1	pH 9.0	0
Est4 ^[35]	Marine mud metagenome	C4	45	8.0	40	2	30 °C	90–95
					60	2	pH 8.0	<30

注：NR：文献中缺少相关资料。
Note: NR: Not record in the literature.

综上所述,酯酶 E22 具有作为工业用酶的潜力。随着研究深入,其功能与结构的内在机理将可能更清晰,通过对其催化机制认识将可促进工业酯酶的理性设计,为酯酶的定向改造提供理论指导。

参 考 文 献

[1] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. Biochemical Society, 1999, 343(1): 177-183

[2] Akoh CC, Lee GC, Liaw YC, et al. GDSL family of serine esterases/lipases[J]. Progress in Lipid Research, 2004, 43(6): 534-552

[3] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 73-81

[4] Gupta MN, Roy I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(13): 2575-2583

[5] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases[J]. Annual Review of Microbiology, 1999, 53(1): 315-351

[6] Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004, 118(1/3): 155-170

[7] Antranikian G, Egorova K. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology//Gerday C, Glansdorff N. Physiology and Biochemistry of Extremophiles[M].

Washington: ASM Press, 2007: 361-406

[8] Jiang H, Zhang SW, Gao HF, et al. Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp. and improvement of thermostability by directed evolution[J]. BMC Biotechnology, 2016, 16: 7

[9] Zheng JY, Liu YY, Luo WF, et al. Biocatalytic resolution of Rac- α -Ethyl-2-Oxo-Pyrrolidineacetic acid methyl ester by immobilized recombinant *Bacillus cereus* esterase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 178(8): 1471-1480

[10] Rahman MA, Culsum U, Tang WH, et al. Characterization of a novel cold active and salt tolerant esterase from *Zunongwangia profunda*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2016, 85: 1-11

[11] Li ZY, Wu YH, Huo YY, et al. Complete genome sequence of a benzo[a]pyrene-degrading bacterium *Altererythrobacter epoxidivorans* CGMCC 1. 7731^T[J]. Marine Genomics, 2016, 25: 39-41

[12] 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(10): 2207-2011

[13] Zobell CE. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes[J]. Journal of Marine Research, 1941, 4: 42-75

[14] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth[J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(23): 8746-8749

[15] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary

- genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [16] 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
- [17] Manco G, Gennaro SD, Rosa MD, et al. Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 221(3): 965-972
- [18] Quinn DM, Shirai K, Jackson RL, et al. Lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis of water-soluble *p*-nitrophenyl esters. Inhibition by apolipoprotein C-II[J]. Biochemistry, 1982, 21(26): 6872-6879
- [19] Swift ML. GraphPad prism, data analysis, and scientific graphing[J]. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 1997, 37(2): 411-412
- [20] Naika GS, Tiku PK. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the structural stability of endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 7341-7345
- [21] Alghamdi AF, Alkhalaf AS, Alkhalaf AS. High performance liquid chromatographic determination of glimepiride and timolol in pharmaceutical formulations using Britton-Robinson buffer in mobile phases[J]. Moroccan Journal of Chemistry, 2016, 4(2): 454-460
- [22] Dukunde A, Schneider D, Lu MJ, et al. A novel, versatile family IV carboxylesterase exhibits high stability and activity in a broad pH spectrum[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(4): 577-587
- [23] 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
- [24] de Santi C, Tedesco P, Ambrosino L, et al. A new alkaliphilic cold-active esterase from the psychrophilic marine bacterium *Rhodococcus* sp.: functional and structural studies and biotechnological potential[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(6): 3054-3068
- [25] Zarafeta D, Moschidi D, Ladoukakis E, et al. Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38886
- [26] Wang GZ, Wang QH, Lin XJ, et al. A novel cold-adapted and highly salt-tolerant esterase from *Alkalibacterium* sp. SL3 from the sediment of a soda lake[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 19494
- [27] Wicka M, Wanarska M, Krajewska E, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a cold-active GDSL-esterase of a *Pseudomonas* sp. S9 isolated from Spitsbergen island soil[J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(1): 117-125
- [28] 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
- [29] 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
- [30] Riedel K, Talker-Huiber D, Givskov M, et al. Identification and characterization of a GDSL esterase gene located proximal to the swr quorum-sensing system of *Serratia liquefaciens* MG1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(7): 3901-3910
- [31] Peng Q, Zhang X, Shang M, et al. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 95
- [32] Fu CZ, Hu YF, Xie F, et al. Molecular cloning and characterization of a new cold-active esterase from a deep-sea metagenomic library[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 90(3): 961-970
- [33] Park HJ, Jeon JH, Kang SG, et al. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 52(2): 340-347
- [34] Hu YF, Liu YH, Li J, et al. Structural and functional analysis of a low-temperature-active alkaline esterase from South China Sea marine sediment microbial metagenomic library[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(11): 1449-1461
- [35] Gao WY, Wu K, Chen LF, et al. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 41
- [36] López-López O, Cerdán ME, González Siso MI. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics[J]. Current Protein & Peptide Science, 2014, 15(5): 445-455
- [37] Wei XL, Jiang XW, Ye LD, et al. Cloning, expression and characterization of a new enantioselective esterase from a marine bacterium *Pelagibacterium halotolerans* B2^T[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013, 97: 270-277
- [38] Sheridan PP, Panasik N, Coombs JM, et al. Approaches for deciphering the structural basis of low temperature enzyme activity[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2000, 1543(2): 417-433
- [39] Dordick JS. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1989, 11(4): 194-211