

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(7):891-896; 4 July 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

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

徐士庆, 胡永飞, 袁爱花, 朱宝利*

(中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】从深海沉积物微生物元基因组文库中克隆新的酯酶基因, 并进行酶学性质研究。【方法】利用含有三丁酸甘油酯的酯酶选择性筛选培养基, 从深海沉积物微生物元基因组文库中筛选得到酯酶阳性 Fosmid 克隆。对筛选得到的 fosmid FL10 进行部分酶切构建亚克隆文库, 筛选得到酯酶阳性亚克隆 pFLS10。PCR 扩增目的片段后与 pET28a 连接构建酯酶基因原核表达质粒, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21。纯化表达产物并对其进行活性测定及酶学性质研究。【结果】序列分析显示该 pFLS10 亚克隆质粒含有一段 924 bp 的 ORF (Open Reading Frame), 与一海洋元基因组文库中筛选出的酯酶 ADA70030 序列一致性为 71%。该酶为一新的低温酯酶, 对 C4 底物(对硝基苯丁酸酯)水解能力最强。该酶最适作用温度为 20 °C, 最适作用 pH 为 7.5, 20 °C 时较为稳定, pH8-10 的范围内有良好的 pH 稳定性, K^+ 、 Mg^{2+} 对该酶具有一定的激活作用, Mn^{2+} 等对其具有不同程度的抑制作用。【结论】应用元基因组技术筛选到了新的酯酶基因 *fls10* 并进行了克隆表达, 该酶在低温及碱性条件下较为稳定且活力较高, 对于工业化生产具有一定的应用潜力。

关键词: 深海沉积物; 元基因组文库; 低温酯酶; 酶学特征

中图分类号: Q814 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0891-06

酯酶 (EC3.1.1.1) 是一大类能够催化酯键水解和形成的酶类, 广泛分布于动物、植物和微生物, 是一种重要的生物催化剂^[1]。酯酶能够水解或者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。酯酶催化反应具有广泛的底物特异性, 在催化底物合成和水解时不需要辅助因子, 在有机溶剂中有很高的稳定性。同时, 酯酶催化反应具有立体特异性和区域专一性的特点。由于以上优点, 酯酶在食品加工、农业、制药工业、制浆造纸、纺织品、皮革处理及烘焙工业、洗涤添加剂、燃料酒精、生物柴油等能源开发方面具有重要的应用价值^[2-4]。

海洋是地球上最大的生态系统, 具有丰富的微

生物资源^[5]。海洋环境包括低温、高温、高静水压、强酸、强碱及营养条件极为贫乏的各种极端环境, 使得生存其中的微生物具有特殊及多样的生理活性。因此, 海洋环境尤其是深海环境中的微生物资源是新型功能基因及具有重要工业应用价值的新酶基因的天然宝库。

元基因组是指某一特定环境中全部微生物的 DNA 总和, 元基因组学技术是指将环境样品中的总 DNA 提取出来后, 利用适宜的载体克隆到宿主细胞中以构建成元基因组文库, 再从中筛选新的活性物质或基因的技术^[6]。元基因组文库的筛选方法主要有两种: 一种是通过序列进行筛选, 包括利用 PCR 和杂交等方法; 另外一种是通过功能进行筛

基金项目: 国家“863 计划” (2007AA09Z443, 2007AA021301); 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-YW-G-022); 国家自然科学基金 (30770060)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

作者简介: 徐士庆 (1986—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生。E-mail: xu.1127@126.com

收稿日期: 2010-03-05; **修回日期:** 2010-04-14

选,即通过文库中的克隆表达的活性有针对性筛选目的产物。目前已利用元基因组技术筛选到了新的脂肪酶、酯酶、蛋白酶、淀粉酶、氧化酶、几丁质酶、核酸酶、色素、抗菌及抗肿瘤活性物质等,而且这些新的生物活性物质已部分用于工业化生产中^[7]。

目前,多数利用元基因组学技术发掘新酶及活性产物主要集中于陆地和淡水环境,从深海沉积物中筛选新酶基因报道较少。本研究基于本实验室前期构建的中国南海海底沉积物的微生物元基因组文库,利用功能筛选的方法从中筛选具有酯裂解酶活性的基因,并对筛选得到的新的酯酶基因 *fls10* 进行克隆表达及酶学性质研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: pUC19 载体、原核表达载体 pET28a、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 购自于北京 Biomed 公司; T4 DNA 连接酶、*Sau3A* I、*Nde* I、*Bam*H I 和 *Hind* III 购自于 NEB, HisTrap HP 购自于 GE Healthcare; Amicon Ultra-10 kDa 离心超滤管、Plasmid Mini Kit 与 Gel Extraction Kit 购自于 OMEGA; 2 \times EasyTaq PCR SuperMix 购自于 TransGen; IPTG、对硝基苯酚 (p-NP)、对硝基苯乙酸酯 (C2)、对硝基苯丁酸酯 (C4)、对硝基苯己酸酯 (C6)、对硝基苯辛酸酯 (C8)、对硝基苯癸酸酯 (C10)、对硝基苯月桂酸酯 (C12)、对硝基苯豆蔻酸酯 (C14)、对硝基苯棕榈酸酯 (C16) 均购自于 Sigma。Thermo 高速离心机、Bio-RAD PCR 仪、苏州净化超净工作台、上海博迅数显电热培养箱等。

1.1.2 筛选培养基: 3% (W/V) 的聚乙烯醇 (PVA) 制备含 100 mL/L 的三丁酸甘油酯乳化液,加 10 mL 乳化液于 90 mL Luria-Bertani 固体培养基中。

1.1.3 样品来源: 深海沉积物微生物元基因组 Fosmid 文库由本实验室构建,样品采自于中国南海琼东南盆地海底沉积物,水深 778 米。该文库含有 20 万克隆,平均插入片段大小为 36 kb。

1.2 酯酶阳性克隆的筛选及亚克隆文库的构建及筛选

将 Fosmid 克隆文库涂布于含有三丁酸甘油酯为底物的平板,30 $^{\circ}$ C 培养 48–72 h。观察菌落周围有透明圈的克隆为阳性克隆。

1.2.1 亚克隆文库的构建及筛选: 将筛选得到的阳性 Fosmid 克隆提取质粒,用 *Sau3A* I 进行部分酶切。琼脂糖电泳分离部分酶切产物,切胶回收

3–5 kb 的 DNA 条带,与 *Bam*H I 酶切的 pUC19 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α , 构建亚克隆文库,亚克隆文库的筛选按如上方法。

1.2.2 基因测序及蛋白序列分析: 将构建的亚克隆质粒送至北京华大公司测序,测序结果采用 Lasergene package, version 7.10 (DNA star, USA)、Clustal W, version 1.83 及 DNAMAN 等软件进行分析。

1.3 酯酶基因原核表达质粒的构建

1.3.1 根据亚克隆质粒测序结果分析后预测得到的酯酶编码序列设计 PCR 引物,使用 Primer Premier 5 软件设计引物。

PCR 序列为: pFLS10F: 5' -GGAATTC CATATGCCAGCCAGCAGCTTC-3'; pFLS10R: 5' -CCCAAGCTTTTAGCTGCCGCCTCCGGA-3' (上游引物添加限制性内切酶 *Nde* I 位点,下游引物添加限制性内切酶 *Hind* III 位点,两者皆由下划线标出)。该引物由上海申能博彩生物科技有限公司引物合成部合成。

1.3.2 模板制备: 抽提 pET28a 载体,用 *Nde* I 和 *Hind* III 进行双酶切,胶回收目的条带。用含目的基因的亚克隆质粒做模板,PCR 扩增目的基因。

1.3.3 PCR: 反应体系总体积为 50 μ L,即 2 \times EasyTaq PCR SuperMix 25 μ L,挑取亚克隆质粒模板,左右引物各加 0.4 μ mol/L。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、50 $^{\circ}$ C 退火 1 min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,循环 30 次,最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。琼脂糖电泳后用 Gel Extraction Kit 回收目的条带。将目的条带与制备的 pET28a 载体连接转化 *E. coli* BL21 (DE3),涂布卡那霉素 (50 mg/L) 抗性平板,菌落 PCR 法鉴定阳性克隆。

1.4 酯酶的表达、纯化^[8]

重组大肠杆菌菌落于 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C, 250 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.5–1.0 时加终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,通过 SDS-PAGE 电泳确定最佳诱导时间。在最佳诱导时间离心收集菌体,用 Binding buffer (20 mmol/L sodium phosphate, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4) 重悬菌体。过量表达酯酶的菌体采用超声破碎法破碎细胞后,用 HisTrap affinity columns 纯化目的蛋白,Amicon Ultra-10 kDa 离心超滤处理去除咪唑。

1.5 酶活及底物特异性测定

酶活测定方法采用 p-NP 比色法^[8]。用异丙醇配成 10 mmol/L 各种脂肪酸碳链长度酯的底物溶

液,在对照管和样品管中各加 pH 7.5 的磷酸缓冲液 3.85 mL 及 0.1 mL 底物溶液,30 °C 水浴保温 5 min,然后在对照管中加入已灭活的酶液 0.05 mL,样品管中加入酶液 0.05 mL,立即混匀计时,在水浴中准确反应 10 min 后,410 nm 分光光度计下测定酶催化产生的 ρ -nitrophenol 的吸收值。酯酶 1 个单位的定义是:在 pH 7.5,30 °C 条件下,每分钟释放 1 μ mol 对硝基苯酚 (ρ -nitrophenol) 所需的酶量。文中所用图表数据均为 3 次平行实验平均值。

1.6 酶学性质

1.6.1 酶的最适作用温度:取一定量的纯化后的酶液,分别在 10 °C、20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 水浴中进行反应,用 ρ -NP 比色法测定其在不同温度下的酶活力。

1.6.2 酶的最适作用 pH 值:在 pH 值为 3-9 范围内,向酶反应体系中分别添加相差 1 个 pH 单位的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 (pH 3-8) 和甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9)。在最适反应温度下,用 ρ -NP 比色法测定 pH 值对酶活的影响。

1.6.3 温度稳定性实验:将一定量的酶液,分别放置在 20 °C、30 °C、40 °C 的水浴内保温,每隔 20 min 在最适反应温度和反应 pH 值的条件下,用 ρ -NP 比色法测定残余酶活。

1.6.4 pH 值稳定性实验:不同 pH 值的缓冲液 (从 pH 3 到 pH 11,每 1 个 pH 单位为一个梯度) 中,按酶液:缓冲液为 1:1 的体积比在 4 °C 下放置过夜,然后将酶液调回到最适作用 pH 值,在最适反应温度下用 ρ -NP 比色法测定残余酶活。

1.6.5 金属离子对酶活的影响:将一定量的酶液与等量 10 mmol/L 的金属离子溶液 (Mn^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+}) 相混合,置于 30 °C 水浴中 30 min 后取出,在最适反应温度和反应 pH 值的条件下用 ρ -NP 比色法测酶活 (以未经处理的酶液活力为 100%),比较各种金属离子对酶活的影响。

2 结果和分析

2.1 测序及序列分析

将酯酶活性阳性亚克隆质粒测序,序列分析得到一段 924 bp 的 ORF,编码 307 个氨基酸,预测分子量大小约为 34 kDa。该序列已提交 GenBank,登录号为 ACL67845。将该蛋白与 GenBank 中其它几种蛋白序列进行比对,发现该蛋白与 Fu, C 等 (未发表) 从中国南海海洋元基因组文库中筛选出的酯酶 (ADA70030) 相似性最大,两者相似性为 71% (图

1),与 *Parvibaculum lavamentivorans* 来源的 α/β 水解酶 (ABS62493) 有 58% 的相似性。进一步分析表明,本研究中的 ACL67845 序列含有酯酶的保守 motif GXSXG 及天门冬氨酸和组氨酸活性位点,如图 2 箭头标注,表明 ACL67845 属于酯酶家族。另外,该蛋白序列中精氨酸等稳定性残基的低数量有利于形成一种更具柔性的三级结构,增加的甘氨酸残基则有助于酶的构象改变以适应低温催化过程,表明该酶符合低温酯酶的结构特点。

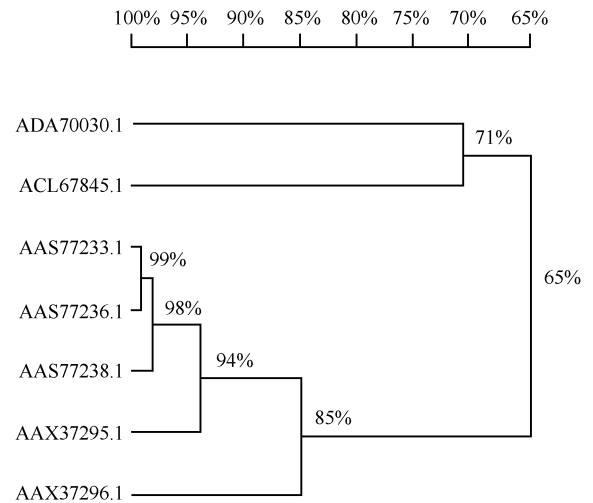


图 1 酯酶和相关蛋白的同源性分析

Fig. 1 Homology analysis of esterase and closely related proteins.

2.2 酯酶的表达与纯化

SDS-PAGE 电泳确定 IPTG 诱导酯酶表达 6 h 时的表达量最高,为最佳诱导时间。在加入 IPTG 6 h 后离心收集菌体,纯化回收酯酶,见图 3。纯化的酯酶在 SDS-PAGE 上条带较为单一,蛋白纯度较高,分子量约为 34 kDa,与基于氨基酸序列计算的理论分

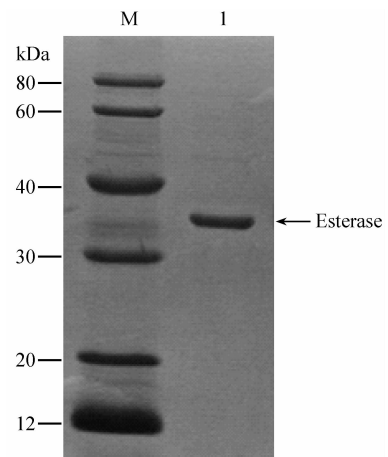


图 3 SDS-PAGE 分析纯化的酯酶

Fig. 3 SDS-PAGE of purified esterase. M. Protein Molecular Weight Marker; 1. Purified esterase.

子量 33.8 kDa 接近。

2.3 酶活及底物特异性测定

利用含不同脂肪酸碳链长度的酯类作为反应的底物,测定酯酶活性,见图4。酯酶对 C4 的底物(对硝基苯丁酸酯)水解能力最强。其次是 C2(对硝基苯乙酸酯)、C6(对硝基苯己酸酯)、C8(对硝基苯辛酸酯)的底物;酯酶对 C10(对硝基苯癸酸酯)、C12(对硝基苯月桂酸酯)、C14(对硝基苯豆蔻酸酯)、C16(对硝基苯棕榈酸酯)的底物水解能力很小或几乎没有水解能力;所以该酶为酯酶而非脂肪酶。

2.4 酯酶的酶学性质

2.4.1 酯酶的最适作用温度:在 10 °C - 50 °C 的

温度范围内,酯酶均呈现酶活性,其最适作用温度为 20 °C 左右。在 10 °C - 50 °C 的测定温度范围内酯酶具有良好的酶学特性,超过 50 °C,酶活力迅速下降。

2.4.2 酯酶的最适作用 pH 值:酯酶最适作用 pH 为 7.5,在 pH 7 - 8 范围内可保持较高的酶活性。

2.4.3 酯酶的温度稳定性:酯酶在 20 °C 保温 100 min 仍有 87% 左右的酶活力,具有较高的稳定性;40 °C 保留酶活力 69%;60 °C 时 60 min 后剩余 76% 酶活力,100 min 后酶活力下降到 38.4%,表明该酯酶在低温条件下较为稳定。

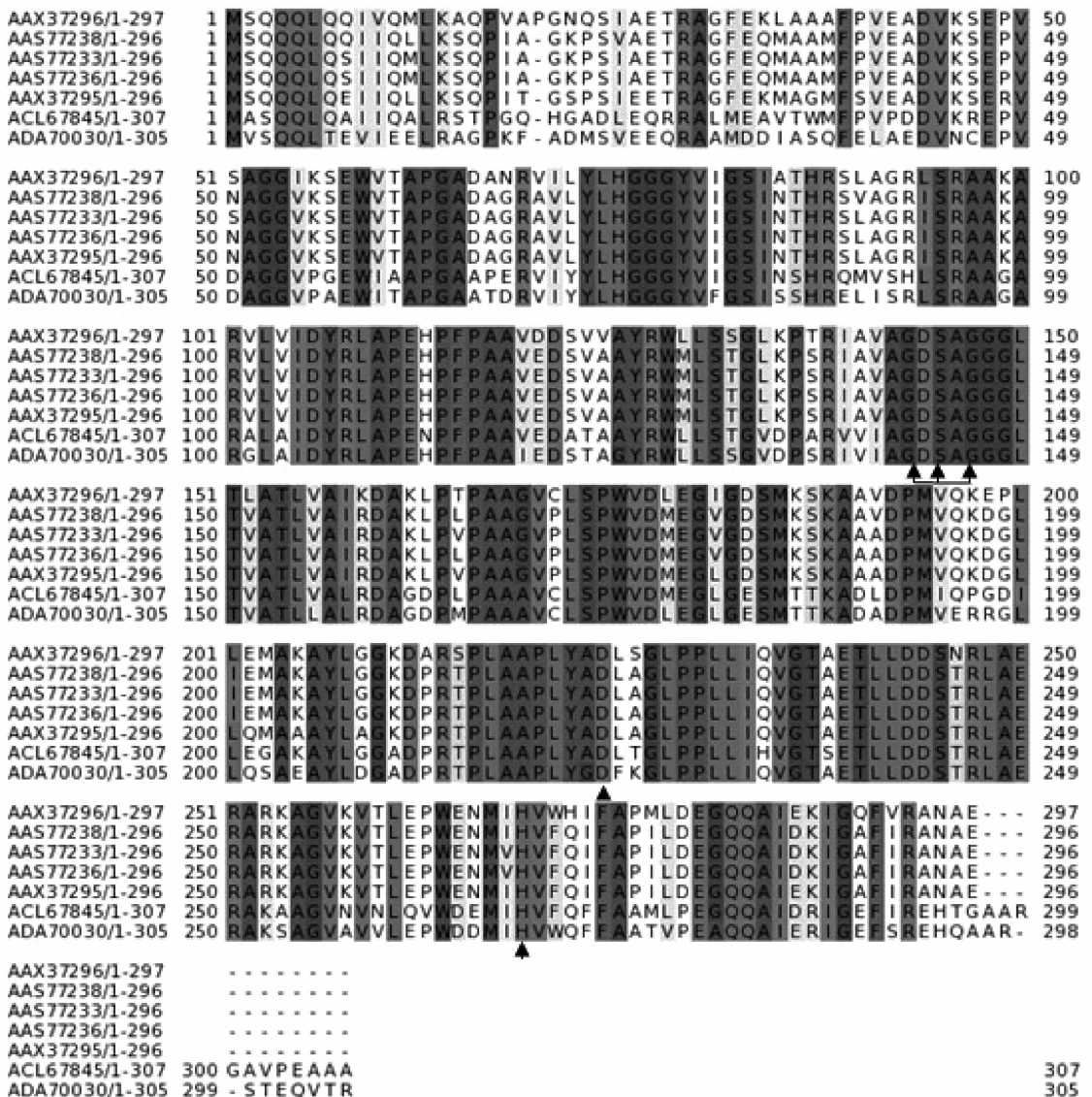


图 2 ACL67845 与其它相关蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of ACL67845 and other related proteins. AAX37296, AAX37295 are esterases from metagenomic library; AAS77233, AAS77236, AAS77238 are lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms; Both ADA70030 and ACL67845 are lipolytic enzyme from marine sediment microbial metagenomic library.

2.4.4 酯酶的 pH 值稳定性: 酯酶在 pH 8 - 10 的范围内, 酶活力可保持在 100% 左右, 说明酯酶在偏碱性条件下较为稳定。

2.4.5 金属离子对酯酶酶活力的影响作用: K^+ (115%)、 Mg^{2+} (134%) 对酯酶具有一定的激活作用, Mn^{2+} (51.7%)、 Zn^{2+} (22.3%)、 Fe^{2+} (30%)、 Cu^{2+} (40.8%) 对酶活性具有不同程度的抑制作用, 其余金属离子对酯酶无明显的激活或抑制作用。

3 讨论

元基因组学技术是一种不依赖于微生物纯培养的方法, 已报道应用元基因组学技术筛选到大量新的酶类、抗生素和其他有价值的活性物质。2000 年, Beja 等从海洋细菌的元基因组文库中发现未被培养的 SAR86 种群 (γ -proteobacteria), 从中发现一种以前只存在于真核生物和古生菌中的视觉光驱动蛋白^[9]。2002 年, Gillespie 等在土壤微生物元基因

组文库中筛选到合成广谱抗菌素 Turbomycin A 和 Turbomycin B 的基因片段, 并揭示了在 *E. coli* 中 Turbomycin A 和 Turbomycin B 的合成机理^[10]。Richardson 等直接从环境 DNA 来源的文库中发现了多种新的淀粉水解酶基因^[11]。

近年来, 越来越多的研究者利用元基因组学技术来发掘新的酯酶/脂肪酶, Ranjan 等以 pUC19 载体构建了池塘微生物元基因组文库, 平均插入片段 3.8 kb, 筛选得到 11 个脂肪酶阳性克隆^[12]。Lee 等利用 fosmid 载体构建了森林表层土微生物元基因组文库, 平均插入片段 35 kb, 从中筛选后得到了 8 个具有脂肪酶特性的克隆子^[13]。本研究利用前期构建的深海沉积物微生物元基因组 fosmid 文库 (平均插入片段 36 kb), 通过三丁酸甘油酯平板筛选得到了酯酶阳性克隆。所发现的新型酯酶丰富了酯酶基因的来源, 为酯酶的体外进化提供了基础。从深海沉积物微生物元基因组文库中筛选到新型酯酶说

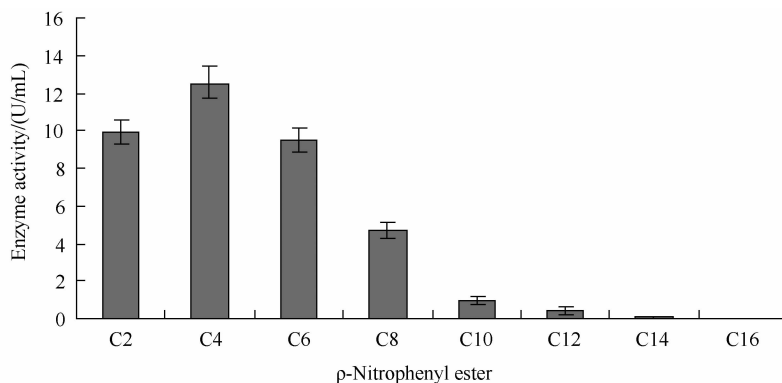


图 4 酯酶的底物特异性

Fig. 4 Substrate specificity of esterase.

明海洋微生物是新型工业用酶的重要来源并证明元基因组文库方案在开发新型基因和生物催化剂中的巨大作用。

本研究筛选得到的酯酶对脂肪酸短链酯类具有很强的特异性, 属于酯酶家族的又一新成员。由于温度和 pH 值对酶活性的影响对于评估酯酶的工业应用价值具有重要的参考意义, 我们对该酶的上述特性做了细致研究。本研究中的酯酶在 10 °C - 50 °C 之间具有很高的催化活力, 最适反应温度为 20 °C, 在 20 °C 保温 100 min 仍有 87% 左右酶活力, 超过 50 °C, 酶活力迅速下降, 说明该酶在低温条件下活性较高并且稳定性较好, 另外, 蛋白序列分析显示该酶具有适应低温催化过程的氨基酸组成和构象特点, 进一步表明该酶为一新型低温酯酶。本研究中的酯酶在 pH 7 - 8 范围内可保持较高的酶活性, 最适反应 pH 为 7.5, 在 pH 8 - 10 的范围内, 酶活力可

保持在 100% 左右, 表明该酶在偏碱性条件下有较好稳定性。另外, K^+ 、 Mg^{2+} 对该酶具有一定的激活作用, Mn^{2+} 等对酶活性具有不同程度的抑制作用。上述性质 (尤其是低温碱性活性) 表明该酶具有重要的潜在应用价值, 对该酶的进一步研究正在进行中。

参考文献

- [1] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterase: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 73-81.
- [2] Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O. Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1994, 15(1): 29-63.
- [3] Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, 409(6817): 258-268.
- [4] Straathof AJ, Panke S, Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(6): 548-556.

- [5] Li X and Qin L. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23(11): 539-543.
- [6] Katrin L, Hubert Z, Michael B, Bernhard H, Christiane B, Herwig B, and Steffen R. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. *Journal of Biotechnology*, 2007, 127(4): 575-592.
- [7] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 75(5): 955-962.
- [8] Kim YJ, Choi GS, Kim SB, Yoon GS, Kim YS, Ryu YW. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*, 2006, 45(2): 315-323.
- [9] Beja O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, Jovanovich SB, Gates CM, Feldman RA, Spudich JL, Spudich EN, DeLong EF. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science*, 2002, 289: 1902-1906.
- [10] Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Jon Clardy, Goodman RM, Jo Handelsman. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomics library of soil microbial DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(9): 4301-4306.
- [11] Richardson TH, Tan X, Frey G, Callen W, Cabell M, Lam D, Macomber J, Short JM, Robertson DE, Miller C. A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(29): 26501-26507.
- [12] Ranjan R, Grover A, Kapardar RK, Sharma R. Isolation of novel lipolytic genes from uncultured bacteria of pond water. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 335(1): 57-65.
- [13] Lee SW, Won K, Lim HK, Kim JC, Choi GJ, Cho KY. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 65(6): 720-726.

Cloning, expression and characterization of a novel esterase from marine sediment microbial metagenomic library

Shiqing Xu, Yongfei Hu, Aihua Yuan, Baoli Zhu*

(Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: [**Objective**] To clone, express and characterize a novel esterase from marine sediment microbial metagenomic library. [**Methods**] Using esterase segregation agar containing tributyrin, we obtained esterase positive fosmid clone FL10 from marine sediment microbial metagenomic library. This fosmid was partially digested with *Sau3A I* to construct the sublibrary, from which the esterase positive subclone pFLS10 was obtained. The full length of the esterase gene was amplified and cloned into the expressing vector pET28a, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 cells. We analyse the enzyme activity and study the characterization of the esterase after its expression and purification. [**Results**] An ORF (Open Reading Frame) of 924 bp was identified from the subclone pFLS10. Sequence analysis indicated that it showed 71% amino acid identity to esterase (ADA70030) from a marine sediment metagenomic library. The esterase is a novel low-temperature-active esterase and had highest lipolytic activity to the substrate of 4-nitrophenyl butyrate (C4). The optimum temperature of the esterase was 20 °C, the optimum pH was 7.5. The esterase in this study had good thermostability at 20 °C and good pH stability at pH8 – 10. Significant increase in lipolytic activity was observed with addition of K⁺ and Mg²⁺, while decrease with Mn²⁺ etc. [**Conclusion**] We obtained the novel esterase gene *fls10* from the marine sediment microbial metagenomic library. The esterase had good thermostability and high lipolytic activity at low temperature and under basic conditions, which laid a basis for industrial application.

Keywords: marine sediment; metagenomic library; low-temperature-active esterase; characterization of esterase

(本文责编:王晋芳)

Supported by the the National High Technology Research and Development Program of China (2007AA09Z443, 2007AA021301) and the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-G-022) and the Project of the National Natural Science Foundation of China (30770060)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807362; E-mail: zhubaoli@im.ac.cn

Received: 5 March 2010/Revised: 14 April 2010