

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(7):857-865; 4 July 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的表面展示及酶学性质

代敏, 纪昌涛, 汪小锋, 智晓燕, 邵化, 徐莉, 闫云君*

分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 【目的】构建疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶 (*Thermomyces lanuginosus* lipase, TLL) 在毕赤酵母 GS115 中的细胞表面展示体系, 筛选展示成功且酶活力及展示率较高的重组子作为全细胞催化剂, 并研究其酶学性质。【方法】克隆 TLL 基因 *tll*, 以酿酒酵母细胞壁蛋白 Sed1p 为锚定蛋白, 构建表面展示载体 pPICZ α A-TLS。重组载体经 *Sac* I 线性化后转入毕赤酵母 GS115 中, 经三丁酸甘油酯平板检测及摇瓶发酵筛选获得高酶活力的毕赤酵母重组子, 采用抗 FLAG 标签一抗和 R-PE 荧光素标记的二抗处理细胞后, 进行荧光显微镜检测和流式细胞仪分析, 并考察全细胞催化剂的最适反应温度和 pH、金属离子耐受性等酶学性质。【结果】成功构建 TLL 毕赤酵母细胞表面展示体系, 筛选到 1 株具有三丁酸甘油酯和橄榄油水解活力的克隆子, 经 1% 的甲醇诱导发酵 120 h 后, 水解橄榄油酶活力达 257.8 U/g 干细胞。经抗体处理后的重组菌发酵细胞在荧光显微镜下呈现强烈的红色荧光, 流式细胞仪分析结果也证实脂肪酶被成功展示在酵母细胞表面, 展示率达 98.36%。展示的 TLL 作为全细胞催化剂水解对硝基苯酚丁酸酯 (pNPB) 的最适温度为 30°C, 最适 pH 为 8.0, 且具备良好的热稳定性和有机溶剂耐受性; K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对其有微弱的激活作用, Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 则有微弱的抑制作用, Cu^{2+} 的抑制作用较强, 而 EDTA、SDS、Tween 20 对酶活力影响不明显。【结论】首次将 TLL 脂肪酶成功展示在毕赤酵母细胞表面, 获得具有较高水解活力和良好酶学特性的全细胞催化剂, 为表面展示 TLL 脂肪酶的规模化应用奠定了技术基础。

关键词: 疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶, 毕赤酵母, 表面展示, 全细胞催化剂, 酶学性质

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012)07-0857-09

表面展示技术是将靶蛋白基因与载体蛋白基因融合, 实现二者在微生物表面融合表达并保持靶蛋白生物活性的技术, 是 George P. Smith 于 1985 年首先提出并逐步发展起来的^[1]。目前, 表面展示系统已被广泛用于高亲和力抗体蛋白富集、多肽药物筛选、蛋白质抗原表位分析以及全细胞催化剂等诸多领域^[2]。酶蛋白通过表面展示技术锚定在微生物

细胞表面, 作为全细胞催化剂已被成功应用于多种工业产品的生产^[3], 具有替代价格昂贵的商业化固定化酶的潜力, 是一种具有广阔应用前景的天然固定化酶制备方法。

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3) 作为一类具有催化油脂水解、转酯、酯化等反应的多功能酶类, 在食品、医药、能源、环境等领域应用十分广泛^[4]。TLL 是一

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31070089, 31170078)

* 通信作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@mail.hust.edu.cn

作者简介: 代敏 (1987-), 女, 四川内江人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学与微生物学研究。E-mail: dai.min_1987@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-12-27; 修回日期: 2012-03-26

种耐热性好、位置特异性和区域选择性强的脂肪酶,已被应用于洗涤剂、精细化学品、食品加工、对映体拆分、生物柴油制备等领域^[5]。

TLL 最早被 Novozymes 公司开发作为洗涤剂添加剂,商业名为 Lipolase。原始的 TLL 作为家用洗涤剂时的温度稳定性和催化活性较低,为了获得在不同溶剂和底物存在条件下稳定性及酶活性都较高的突变体,人们采用蛋白质工程方法对该脂肪酶盖子结构周围的氨基酸残基进行定点突变^[6]。Danielsen^[7]等首先将 TLL 展示在大肠杆菌噬菌体 M13 外壳蛋白 III 上,用于 TLL 突变库筛选,但其展示率很低,尚不能用作全细胞催化剂。商业化的 TLL 固定化酶名为 Lipozyme TLIM,目前已广泛应用于油脂水解^[8]、生物柴油制备^[9]及 DHA 富集^[10]等多种工艺研究,但昂贵的价格限制了其规模化应用。

巴斯德毕赤酵母与传统酵母表达系统相比具有外源基因表达稳定,表达产物适度糖基化,易于高密度发酵等优点,是理想的细胞表面展示宿主菌^[11]。Sed1p 是酵母细胞在稳定期大量表达的细胞壁蛋白质之一,由 *sed1* 基因编码,在细胞稳定期的防御机制中起着重要作用^[12],可用作锚定蛋白展示脂肪酶^[13]。然而,到目前为止,以 Sed1p 为锚定蛋白在毕赤酵母细胞表面展示 TLL 尚未见文献报道。本研究拟采用酿酒酵母的 Sed1p 为锚定蛋白,实现 TLL 在毕赤酵母 GS115 细胞表面的大量展示,制备具有优良催化特性的脂肪酶全细胞催化剂,以期降低 TLL 的生产成本,为其规模化工业应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

DH5 α 、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 和 pPICZ α A 载体均购自 Invitrogen 公司;质粒 pUC-TLL 为本实验室构建并保存。

1.1.2 培养基: LLB、YPD、YPDS、BMGY 和 BMMY 等培养基均参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册。酶活检测平板为三丁酸甘油酯平板 (100 mL 的 BMMY 中加入 500 μ L 三丁酸甘油酯乳化液) 和橄榄油乳化液-罗丹明 B 平板 (100 mL 的 BMMY 培养基中加入 2 mL 橄榄油乳化液和 400 μ L 0.2% 的罗丹明 B)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS、限制性内切酶和 DNA 连接试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司;质粒小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司;不同碳链长度羧酸对硝基苯酚酯 (C2-C16)、D-生物素和 D-山梨醇均购自美国 Sigma 公司;酵母基础氮源购自美国 BD 公司;其他所用化学试剂均为分析纯,购于上海国药集团化学试剂有限公司;兔抗 FLAG-tag 抗体和 R-PE 标记山羊抗兔 IgG 二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司。GenePulser II 电穿孔仪购自美国 Bio-RAD 公司;高速离心机和 PCR 仪均购自德国 Eppendorf 公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;FC500 流式细胞仪购自美国 Beckman coulter 公司;正置荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.1.4 引物: 用于扩增去掉信号肽且 N-端带抗原检测标签 FLAG 的 *tll* 基因 (Gene Bank: AF054513) 和锚定蛋白基因 *sed1* 的引物如表 1 所示。其中,下划线部分均为酶切位点,*Sed1F* 和 *TllF* 的斜体部分分别为 GS linker 序列和抗原标签 FLAG 编码基因。PCR 引物均由上海生物工程技术有限公司合成。

表 1 本文所用引物

Table 1 The primers used in this article

Primer	Sequence (5'→3')	Size /bp	Restriction site
<i>Sed1F</i>	AACACGCGTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGCTCAATTTTCCAACAGTACATCTGCTTC	80	<i>MluI</i>
<i>Sed1R</i>	ATTAGCGGCCGCTTATAAGAATAACATAGCAACAC	39	<i>NotI</i>
<i>TllF</i>	GATGAATTCGACTACAAGGATGACGATGACAAG GAGGTCTCGCAGGATCTGTGTTA	55	<i>EcoRI</i>
<i>TllR</i>	GATACGCGTAAGACATGTCCCAATTAACCCG	31	<i>MluI</i>

1.2 表面展示载体 pPICZ α A-TLS 的构建

用玻璃珠法提取酿酒酵母 EBY100 的基因组

DNA^[14],以其为模板,以 *Sed1F*/*Sed1R* 为引物,PCR 扩增 5'-端含 GS linker 序列的 *Sed1* 基因。以 pUC-

TLL 质粒 DNA 为模板, 以 *TUF/TUR* 为引物, PCR 扩增 5'-端含 FLAG 序列的 *tll* 基因。两种 PCR 产物分别经 *EcoR* I/*Mlu* I 和 *Mlu* I/*Not* I 双酶切后与 *EcoR* I/*Not* I 双酶切后的 pPICZ α A 载体连接, 并转化 *E. coli* DH5 α , 对 LLB 抗性平板 (含 25 μ g/mL Zeocin) 上生长的克隆子进行鉴定, 将阳性克隆子送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3 表达载体的酵母转化及筛选

将测序正确的质粒 pPICZ α A-TLS 用 *Sac* I 线性化, 取 8–10 μ g 与 80 μ L *P. pastoris* GS115 感受态细胞混合, 在电转参数为 1500 V、25 μ F、200 Ω 的条件下转化。将电转后的细胞涂布在含 100 μ g/mL Zeocin 的 YPDS 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 2–3 d, 将长出的转化子转移到三丁酸甘油酯平板上, 添加 1% 的甲醇诱导 2–3 d 后, 选取水解圈较大的重组子进行发酵, 同时提取重组菌株的基因组 DNA 进行 PCR 验证。

1.4 高产菌株的筛选

阳性克隆子的摇瓶发酵培养参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册, 每 24 h 添加 1% 的甲醇诱导培养至 120 h 后测定酶活力。

1.5 脂肪酶酶活力定量检测

收集发酵培养 120 h 的酵母细胞, 用 50 mmol/L pH 8.0 Tris-HCl 洗两次, 重悬后用碱式滴定法测定脂肪酶活力^[15]。操作步骤如下: 4 mL 橄榄油乳化液 (橄榄油:PVA = 1:3, v/v), 5 mL Tris-HCl (pH 8.0, 50 mmol/L) 和 1 mL 发酵细胞悬液加入到 25 mL 磨口三角瓶中, 40 $^{\circ}$ C 水浴锅反应 10 min, 立即加入 15 mL 终止液 (乙醇:丙酮 = 1:1, v/v) 终止反应, 用 50 mmol/L NaOH 进行滴定, 以 1% 酚酞为指示剂, 酶活力测 3 次取平均值。在以上测定条件下, 脂肪酶每分钟催化水解橄榄油产生 1 μ mol 游离脂肪酸所需的酶量定义为 1 个活力单位 (U)。酶活力计算公式如下:

$$\text{酶活 (U/g)} = \frac{(V_2 - V_1) \times M \times N}{t \times m}$$

其中, V_1 和 V_2 分别为滴定结束时对照和样品消耗的 NaOH 体积 (mL); M 为 NaOH 浓度 (mmol/L), N 为稀释倍数; t 为反应时间 (min); m 为 1 mL 细胞悬液的干细胞质量 (g)。

1.6 免疫荧光显微镜检测及流式细胞仪分析

取培养 120 h 的发酵液, 离心收集菌体, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 洗涤菌体 2 次。用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4, 含 1 mg/mL BSA) 重悬菌

体, 然后加入 1 μ g 兔抗 FLAG 标签抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, 离心后用 PBS 缓冲液洗 2 次, 重悬在 PBS 缓冲液中, 加入 1 μ g R-PE 标记山羊抗兔 IgG 二抗后, 冰上放置 1 h。12000 r/min 离心 1 min, 用 PBS 缓冲液洗 2 次, 制片, 置于荧光显微镜下观察, 同时将余下样品用于流式细胞仪分析。

1.7 酶学性质研究

以对硝基苯酚酯为底物, 即采用 *p*NP 比色法^[16] 测定展示脂肪酶在不同条件下的残余酶活力, 系统研究展示脂肪酶的酶学特性, 每个条件均测定 3 次后取平均值。

1.7.1 底物碳链长度特异性: 分别配制 10 mmol/L 不同碳链长度羧酸对硝基苯酚酯 (C2、C4、C8、C10、C12、C14、C16) 的乙醇溶液, 分别加入 4 倍和 95 倍体积的无水乙醇和 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液作为反应液, 加入脂肪酶全细胞催化剂后于 40 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 测定 OD_{405} , 确定展示脂肪酶的底物碳链长度偏好性。

1.7.2 最适温度: 测定细胞悬液在不同温度 (10 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C), pH 8.0 条件下水解 *p*NPB 的活力, 以此确定展示脂肪酶的最适反应温度。

1.7.3 最适 pH: 温度为 30 $^{\circ}$ C 条件下, 测定细胞悬液在不同 pH 缓冲液 (6.0–10.0) 下水解 *p*NPB 的活力, 以确定展示脂肪酶的最适反应 pH。测定过程中使用的 pH 缓冲液有: 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 6.0–7.5)、50 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 8.0–9.0)、50 mmol/L Glycine/NaOH buffer (pH 9.5–10.0)。

1.7.4 温度稳定性及有机溶剂耐受性: 为了考察展示脂肪酶的温度稳定性, 将其置于 40 $^{\circ}$ C 水浴处理 1–6 h, 于最适温度和 pH 条件下测定残余酶活力; 为了考察全细胞催化剂对有机溶剂的耐受性, 分别向细胞悬液中加入终浓度为 30% (v/v) 的聚乙二醇 600 (PEG600)、二甲基亚砜 (DMSO)、甲醇、乙醇和异丙醇, 室温处理 30 min, 于最适温度和 pH 条件下测定残余酶活力。

1.7.5 金属离子、络合剂及表面活性剂耐受性: 将全细胞置于终浓度为 10 mmol/L 的 KCl、CaCl₂、MgCl₂、MnCl₂、NiCl₂、CuCl₂、EDTA、SDS、Tween 20 中分别处理 30 min 后, 于最适温度和 pH 条件下测定展示脂肪酶的残余酶活力。

2 结果

2.1 表面展示载体 pPICZ α A-TLS 的构建

tll 和 *sed1* 基因片段的 PCR 产物大小分别为 846 bp 和 1052 bp。表面展示载体 pPICZ α A-TLS 示意图和双酶切验证如图 1 所示,测序结果表明编码框正确,说明表面展示载体 pPICZ α A-TLS 构建成功。

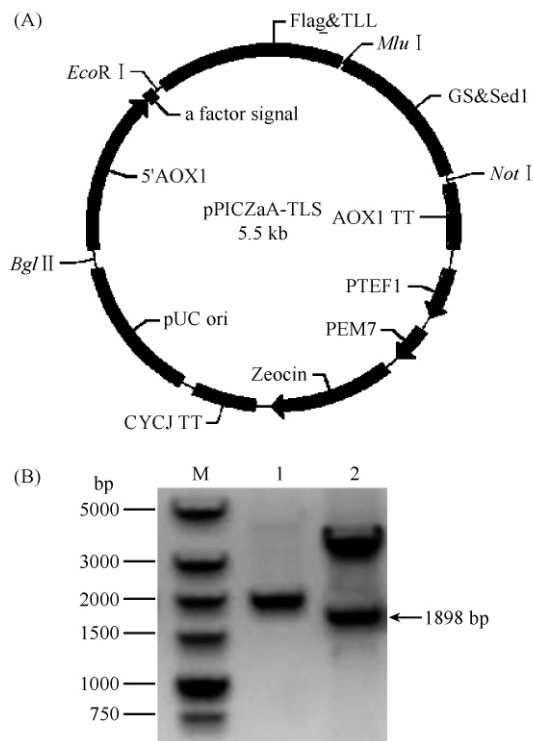


图 1 表面展示载体 pPICZ α A-TLS 的示意图及酶切验证

Fig. 1 Schematic diagram of display vector pPICZ α A-TLS and digestion. A: Schematic diagram of pPICZ α A-TLS; B: M. DS5000 DNA Marker; 1. Plasmid of pPICZ α A-TLS; 2. Digestion of pPICZ α A-TLS.

2.2 表面展示载体的转化和高酶活重组子的筛选

pPICZ α A-TLS 电转入 *P. pastoris* GS115 后,得到重组菌株 GS115/pPICZ α A-TLS。挑取 24 个阳性克隆子进行摇瓶发酵筛选,诱导培养 120 h 后,重组子的酶活力达到峰值,最终筛选到 1 株橄榄油水解活力为 257.8 U/g 干细胞的 19[#]重组子。该重组子的 PCR 验证、三丁酸甘油酯及橄榄油-罗丹明平板检测结果如图 2 所示。

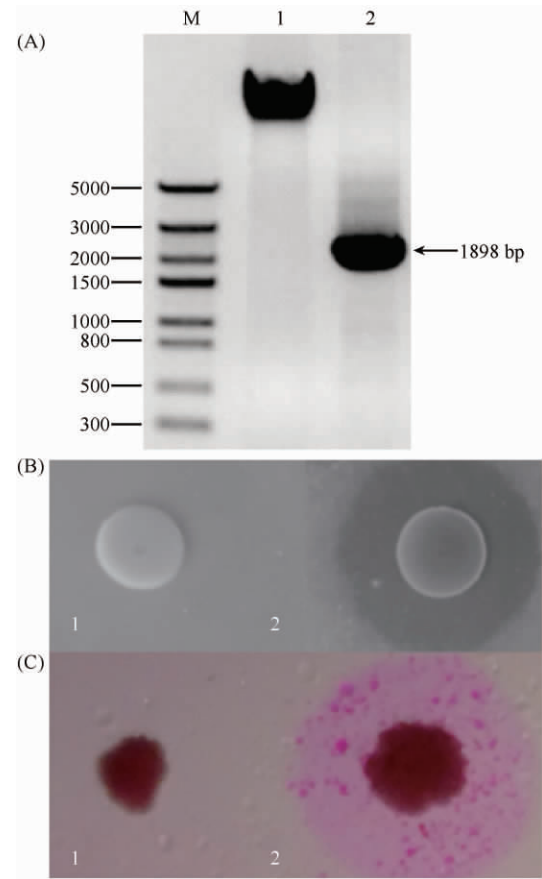


图 2 GS115/pPICZ α A-TLS 19[#]克隆子的 PCR 验证及酶活力检测

Fig. 2 PCR amplification and detection of lipase activity of GS115/pPICZ α A-TLS 19[#]. A: PCR amplification. M. Trans 5000 DNA Marker; 1. Genome DNA; 2. PCR amplification of fused gene *tll-sed1*. B: Tributyrin plate assay. 1. GS115; 2. GS115/pPICZ α A-TLS 19[#]; C: Rhodamine B-olive oil plate assay. 1. GS115; 2. GS115/pPICZ α A-TLS 19[#].

2.3 表面展示脂肪酶的免疫荧光检测及流式细胞仪分析

用荧光显微镜对重组酵母细胞进行荧光观察,结果如图 3 所示。在展示脂肪酶的细胞表面,融合表达的 FLAG 抗原标签与特异性标签抗体(一抗)相结合,经藻红蛋白(R-PE)标记的二抗特异性反应后,显示出较强的红色荧光(图 3-B),而对照菌株 *P. pastoris* GS115 细胞表面无荧光(图 3-D)。说明 TLL 已经通过锚定蛋白 Sed1p 被展示在毕赤酵母细胞表面。样品经流式细胞仪 488 nm 氩氛激光器进一步分析后,与阴性对照细胞 GS115/pPICZ α A 相比,重组菌株 GS115/pPICZ α A-TLS 19[#] 细胞表面平均荧光强度较强(图 4),出现了明显的荧光峰漂

移,进一步说明融合蛋白成功展示在毕赤酵母细胞表面,且展示率(样品的峰面积扣除与阴性对照的

重叠部分后所占的比例)达到 98.36%。

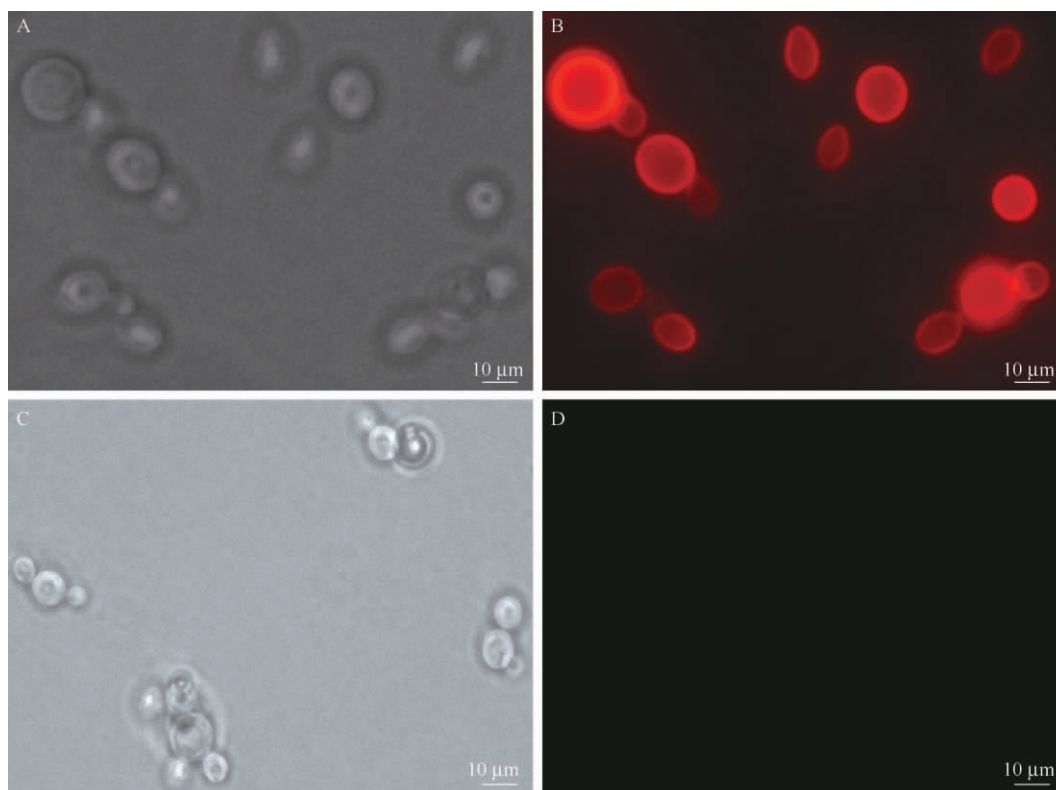


图 3 重组酵母细胞的荧光显微镜检测

Fig. 3 Detection of the fermentation cells by the fluorescence microscope. A: GS115/pPICZ α A-TLS under white light; B: GS115/pPICZ α A-TLS under fluorescent light; C: GS115/pPICZ α under white light; D: GS115/pPICZ α under fluorescent light.

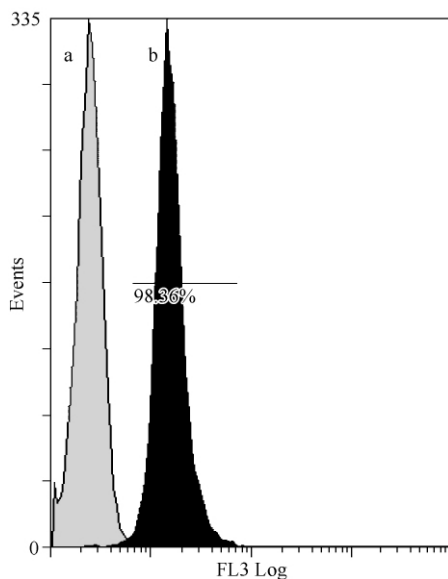


图 4 表面展示 TLL 的流式细胞仪分析

Fig. 4 Analysis picture of fermentation cells by Flow Cytometer. a: Peak of GS115/pPICZ α ; b: Peak of GS115/pPICZ α A-TLS.

2.4 表面展示脂肪酶酶学性质

2.4.1 底物碳链长度特异性:展示的 TLL 对底物碳链长度的偏好性结果如图 5-A 所示。展示的 TLL 水解对硝基苯酚丁酸酯 (C4, *p*NPB) 时酶活力最高,其次为对硝基苯酚辛酸酯 (C8),对长链对硝基苯酚酯 (C14-C16) 也有一定的水解活力。由此可知,展示 TLL 的最适底物为 *p*NPB,且偏好水解短链和中链长度的对硝基苯酚酯。

2.4.2 最适温度和最适 pH:以 *p*NPB 为底物,测定展示 TLL 的最适反应温度 (图 5-B) 和最适反应 pH (图 5-C)。展示 TLL 的最适反应温度为 30℃,随着温度升高,酶活力逐步下降,60℃ 时仍能保持 60% 以上的酶活力,但 70℃ 时酶活力迅速下降至 20% 左右;pH 8.0 时酶活达到最大值,pH 8.0-9.0 时,展示 TLL 的酶活力变化不大,pH 9.5 时,其酶活力迅速下降至 20%,pH 10.0 时该酶几乎完全失活。

2.4.3 温度稳定性和有机溶剂耐受性:展示的 TLL 的温度稳定性结果如图 5-D 所示。展示的 TLL 在

1 h 内活力能保留 90% ,3 h 时活性能保留 70% 左右。随着时间的延长,其活性缓慢下降,6 h 时,酶活力仍能保持在 50% 左右。有机溶剂耐受性结果如图 5E 所示,有机溶剂处理全细胞 30 min 后,酶

活力均有一定程度下降。其中展示的 TLL 经 PEG600、甲醇和 DMSO 处理后残余酶活分别为 56%、34% 和 25%,但其对高浓度的乙醇、异丙醇耐受性较差。

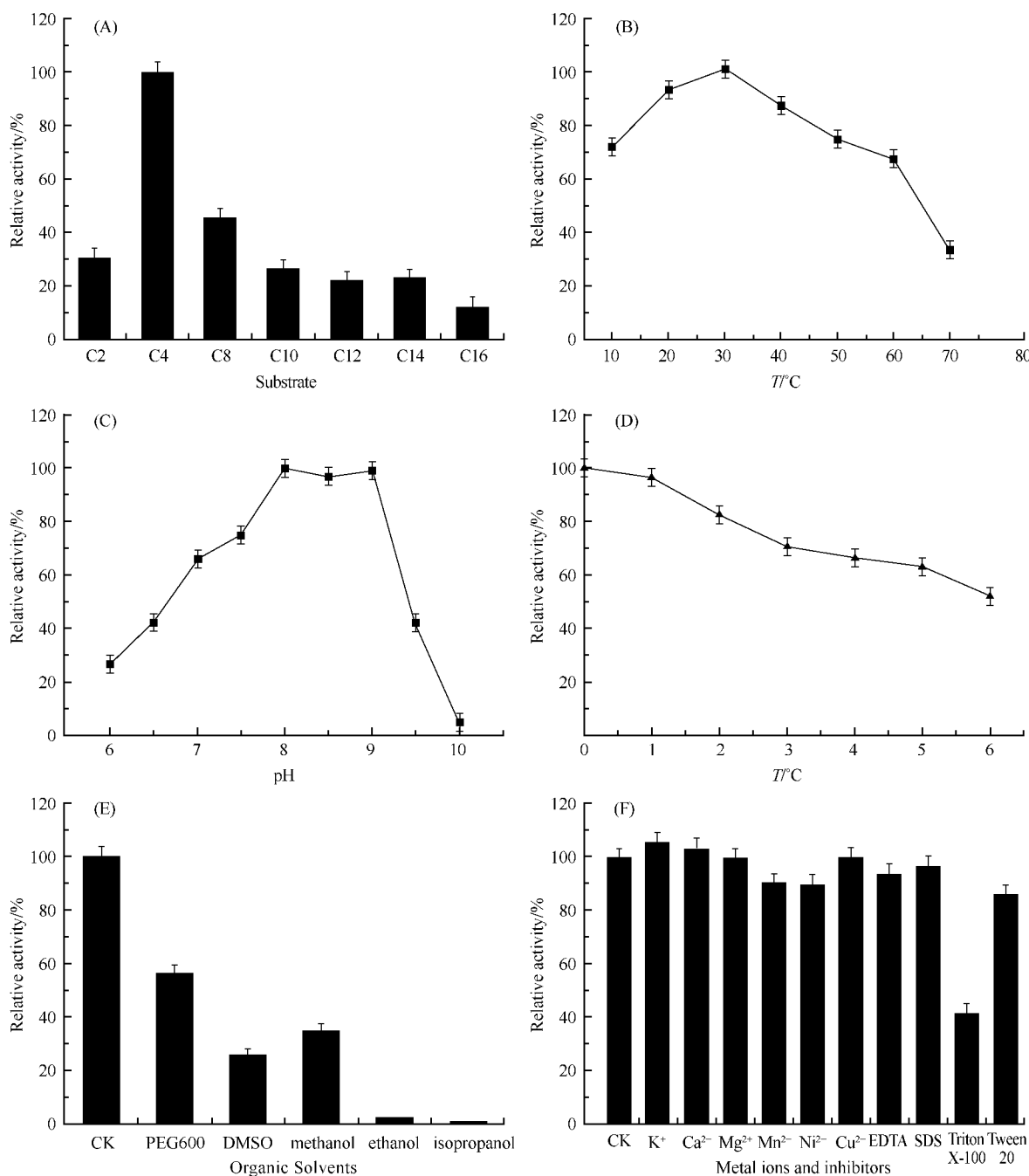


图 5 展示 TLL 的底物特异性、最适反应温度和 pH、温度稳定性和有机溶剂耐受性以及金属离子、络合剂及表面活性剂对展示 TLL 的影响

Fig. 5 Effects of substrate, temperature, pH, metallic ions and detergents on the displayed TLL and its thermostability and organic tolerance. A: Substrate specificity of the displayed TLL; B: Effects of temperature on the activity of the displayed TLL; C: Effects of pH on the activity of the displayed TLL; D: Thermostability of the displayed TLL; E: Organic tolerance of the displayed TLL; F: Effects of metallic ions and detergents on the displayed TLL.

2.4.4 金属离子、络合剂及表面活性剂耐受性: 由图 5-F 可知, K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对展示的 TLL 有微弱促进作用; Mn^{2+} 、 Ni^{2+} 对其有微弱抑制作用, 其酶活力保持在 90% 以上; 络合剂 EDTA、表面活性剂 SDS、Tween 20 处理全细胞后酶活力均保持在 80% 以上; Triton X-100 处理全细胞后酶活力显著下降, 仅保持了 40% 的活力, 而 Cu^{2+} 对其有强烈的抑制作用, 酶活仅保留 10% 左右。

3 讨论

目前, 以毕赤酵母为宿主的细胞表面展示采用的锚定蛋白几乎都源于酿酒酵母。锚定蛋白的稳定性、分子量大小和空间结构等对展示酶蛋白活性影响较大。刘文山^[17]报道锚定蛋白远离活性中心有利于展示脂肪酶活力的发挥。采用生物信息学软件 VMD 6.0 对 TLL 蛋白质结构进行可视化分析后发现活性中心与 C 末端和 N 末端距离相当, 故分别选取絮凝素蛋白 Flop1 N-端部分缺失的 Flos (C 末端融合) 和细胞壁蛋白 Sed1p (N 末端融合) 作为锚定蛋白, 构建了毕赤酵母展示系统。依锚定效率 (数据未列出), 最终选择 Sed1p 作为锚定蛋白用于 TLL 的展示研究。

来源于酿酒酵母 EBY100 的 Sed1p 是一类新的葡聚糖酶提取型细胞壁蛋白, 含有一个预测的 GPI 锚定信号序列。大部分葡聚糖酶提取型细胞壁蛋白如 Cwp1p、Cwp2p、Tir1p 含 O-糖基化位点且富含丝氨酸, 而 Sed1p 含 6 个半胱氨酸和 7 个预测的 N-糖基化位点^[12], 这种结构特征可能使 Sed1p 高度 N-糖基化, 并通过二硫键与其他细胞壁成分共价交联而保持高度稳定性。本研究采用 Sed1p 作为锚定蛋白展示 TLL 时, 在荧光显微镜下可以看到重组表达 TLL 的细胞表面呈明显的红色荧光, 流式细胞仪分析脂肪酶展示率达 98.36%。研究结果表明, 脂肪酶 TLL 不仅被成功展示在毕赤酵母细胞表面, 且与之融合表达的 Sed1p 与酵母细胞壁牢固结合, 稳定性较高。

TLL 是一种耐热性强、位置特异性和区域选择性好的脂肪酶, 被广泛应用于洗涤剂、对映体拆分、生物柴油制备等领域。Danielsen^[7]等对该脂肪酶盖子结构周围的 9 个氨基酸残基进行随机突变和体外筛选, 最终获得 84 个有脂肪酶活性的克隆子, 但其

脂肪酶活力均低于原始的 Lipolase。Zheng^[18]等克隆并在毕赤酵母中分泌表达了 TLL, 诱导发酵 144 h 后, 橄榄油水解活力为 61 U/mL。本文展示的 TLL 橄榄油水解活力达 257.8 U/g 干细胞, 与高巍^[19]等采用同一方法测得的商业化固定化酶 TLIM (249.8 U/g) 的酶活力相当。

本文采用对硝基苯酚酯对展示的 TLL 的酶学性质进行了系统研究。展示的 TLL 水解 pNPB 的最适 pH 为 8.0, 并在 pH 8.0–9.0 范围内保持较高酶活力, 与 Zheng 等^[18]和 Arima 等^[20]报道游离的 TLL 相似。本文展示的 TLL 水解 pNPB 的最适反应温度为 30℃, 而 Zheng 等^[18]报道的游离脂肪酶 TLL 水解橄榄油最适温度为 60℃。两者最适温度存在较大差异的原因可能是, 过高的反应温度对底物分子的稳定性存在影响, 因为对硝基苯酚酯在高温下容易发生自身分解, 而橄榄油分子则更为稳定, 这也是 Mogesen^[21]等仅在 25℃ 条件下测定 TLL 水解 pNPB 的酶活力的原因。虽然展示的 TLL 水解 pNPB 的最适温度与其游离酶水解橄榄油时的最适温度相差较大, 但其温度稳定性与游离酶相比却有较大提高, 如在最适温度条件下, Zheng 等^[18]表达的游离酶 10 min 后酶活下降了 50%, 而本文展示的 TLL 在 1 h 内仅下降 5%。10 mmol/L 的 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对展示的 TLL 具有微弱的激活作用, 这与 Zheng^[18]报道的 K^+ 产生较大抑制作用, 而 Ca^{2+} 有一定激活作用的结果存在差异。可能的原因是, 展示的 TLL 空间结构受到融合蛋白 Sed1p 的影响, 导致其对部分金属离子的依赖性发生变化。不少研究表明不同浓度的金属离子对酶活性的影响存在差异^[21], 本文展示的 TLL 对高浓度的金属离子具有较强耐受性。本文用 10 mmol/L SDS 处理展示 TLL 全细胞催化剂, 其酶活力几乎没有变化, 这与 Mogesen^[22]等和 Fino^[23]等用相同浓度 SDS 处理后的 TLL 的相对酶活力相比有明显提高。

本文展示的 TLL 用作全细胞催化剂时, 不仅具有较高的催化活性, 而且对部分有机溶剂、大多数金属离子、络合剂及表面活性剂具有一定耐受性, 操作稳定性较好, 发酵后分离简单, 能大幅降低酶的生产成本, 是一种“天然固定化酶”, 以其作为全细胞催化剂具有替代昂贵的商业固定化酶而用于工业化生产的巨大潜力。

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] Kondo A, Ueda M. Yeast cell-surface display—applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64 (1) : 28-40.
- [3] Aufderheide KJ. An overview of techniques for immobilizing and viewing living cells. *Micron*, 2008, 39 (2) : 71-76.
- [4] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16 (9) : 396-403.
- [5] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, 62 (3-4) : 197-212.
- [6] Wolff AM, Showell MS. Application of lipases in detergents. New York: Marcel Dekker, 1997: 93-97.
- [7] Danielsen S, Eklund M, Deussen H J, Graslund TG, Nygren PA, Borchert TV. In vitro selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor. *Gene*, 2001, 272 (1-2) : 267-274.
- [8] Rodrigues RC, Ayub MA. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process biochemistry*, 2011, 46 (3) : 682-688.
- [9] Verdugo C, Luna D, Posadillo A. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: optimization by response surface methodology. *Catalysis Today*, 2011, 167 (1) : 107-112.
- [10] Martin L, Gonzalez PA, Robles A, Rodriguez A, Hita E, Jimenez MJ, Esteban L, Molina E. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) by kinetic resolution by a *Thermomyces lanuginosus* lipase. *New Biotechnology*, 2009, 25 : 157-161.
- [11] De Schutter K, Lin Y C, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouze P, Van de Peer Y, Callewaert N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 2009, 57 (6) : 561-566
- [12] Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, Iimura Y, Ito K. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (13) : 3381-3387.
- [13] Su GD, Zhang X, Lin Y. Surface display of active lipase in *Pichia pastoris* using Sed1 as an anchor protein. *Biotechnology Letters*, 2010, 32 (8) : 1131-1136.
- [14] Garten Y, Kaplan S, Pilpel Y. Extraction of transcription regulatory signals from genome-wide DNA-protein interaction data. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (2) : 605-615.
- [15] Macedo GA, Park YK, Pastore GM. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp.. *Revista de Microbiologia*, 1997, 28 (2) : 90-95.
- [16] Lee SH, Choi JI, Park SJ, Lee SY, Park BC. 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. *Applied and Environment Microbiology*, 2004, 70 (9) : 5074-5080.
- [17] 刘文山. 脂肪酶在酿酒酵母中的表面展示研究. 华中科技大学博士论文, 2010.
- [18] Zheng YY, Guo XH, Song NN, Li DC. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: gene cloning, expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 69 : 127-132.
- [19] 高巍, 杨立昌, 洪鲲, 乙引. TLIM 脂肪酶对油脂水解特性的研究. *粮油加工 (Cereals and Oils Processing)*, 2010, 4 : 15-18.
- [20] Arima K, Liu WH, Beppu T. Studies on the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1972, 36 (5) : 893-895.
- [21] Zheng XM, Chu XY, Zhang W, Wu NF, Fan YL. A novel cold-adapted lipase from *Acinetobacter* sp. XMZ-26: gene cloning and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90 (3) : 971-980.
- [22] Mogensen JE, Sehgal P, Otzen DE. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry*, 2005, 44 (5) : 1719-1730.
- [23] Fano M, van de Weert M, Moeller EH, et al. Ionic strength-dependent denaturation of *Thermomyces lanuginosus* lipase induced by SDS. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2011, 506 (1) : 92-98.

Cell surface display of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* and its characterization

Min Dai, Changtao Ji, Xiaofeng Wang, Xiaoyan Zhi, Hua Shao, Li Xu,
Yunjun Yan*

Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: [Objective] To construct a novel cell-surface display system of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) based on an efficient anchor protein Sed1p in *Pichia pastoris*, to screen recombinant strains with high enzyme activity and displaying rate, and further to characterize the enzyme. [Methods] The lipase gene from *T. lanuginosus* was sub-cloned and fused with the anchor protein gene *sed1* from *Saccharomyces cerevisiae* to construct a display vector pPICZ α A-TLS. The vector pPICZ α A-TLS was linearized by *Sac* I and then transformed into *P. pastoris* GS115 by electroporation. After screening by tributyrin medium, a clone exhibiting the maximum lipase activity in shaking flask was chosen to treat with rabbit anti-FLAG-tag and R-PE-conjugated goat anti-rabbit IgG, and then its positive location on the cell wall was detected by fluorescence microscope and flow cytometer. The recombinant strain displaying TLL was further characterized as a whole-cell catalyst. [Results] A novel cell-surface display system of *T. lanuginosus* lipase was successfully established, and a clone with lipase activity of 257.8 U/g dry cells in shaking flask was obtained. The displayed TLL on the cell surface was confirmed by immunofluorescence, and the treated cells under the fluorescence microscope emitted brightly red fluorescence, and the displaying rate was 98.36% detected by Flow Cytometer. The displayed TLL exhibited excellent thermostability and high tolerance to some organic solvents, and its maximal activity was observed at 30°C and pH 8.0. The lipase activity was a little enhanced by K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ and strongly inhibited by Cu²⁺, Mn²⁺ and Ni²⁺. However, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium lauryl sulfate (SDS) and Tween 20 showed little effect on the displayed TLL. [Conclusion] The lipase TLL was successfully displayed on the cell surface of *P. pastoris* by the anchor protein Sed1p for the first time to obtain a whole-cell catalyst, which had high hydrolytic activity and excellent enzymatic characterization. Thus, we here established a solid foundation for industrial applications of the displayed lipase TLL.

Keywords: *Thermomyces lanuginosus* lipase, *Pichia pastoris*, surface display, whole-cell catalyst, enzymatic characterization

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of China (31070089, 31170078)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@mail.hust.edu.cn

Received: 27 December 2011/Revised: 26 March 2012