

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(8):1095-1101; 4 August 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

黑曲霉(*Aspergillus niger*)F044 脂肪酶新型基因 *lipB* 的克隆、表达及酶学性质分析

杨江科, 张正平, 刘立营, 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】本研究拟克隆新型的黑曲霉(*Aspergillus niger*)脂肪酶(EC 3.1.1.3)基因, 实现其在大肠杆菌(*Escherichia coli*)的高效表达, 并对表达产物进行系统的酶学性质分析, 为该脂肪酶的工业化生产及应用奠定基础。【方法】通过 PCR 和 RT-PCR 克隆脂肪酶基因, 并将其开放式阅读框(ORF)克隆入融合表达载体 pET28a ; 表达产物经 Ni-agarose 纯化后对 LipB 进行酶学性质分析, 并通过圆二色谱进行结构分析。【结果】成功地从 *A. niger* F044 中克隆了一个新型的脂肪酶基因 *lipB*, 获得了该基因的全基因组序列和 cDNA 序列(GenBank :FJ536287、FJ536288)并实现了其在 *E. coli* 中的高效表达。LipB 分子量约为 43.0 kDa, 最适底物为 pNPC(C8), 酶学动力学常数 $K_m = 5.98$ mmol/L, 最适反应温度为 50℃, 最适 pH 为 6.0; 该酶能在 40℃ 条件下保持稳定, 在 60℃ 条件下处理 1 h 后残余酶活仅为 18.8%, 该酶对 Ca^{2+} 敏感, 当脂肪酶经 2 mmol/L Ca^{2+} 处理 1 h 后, 酶活提高了 2.6 倍。圆二色谱分析表明, 该酶在 Ca^{2+} 处理前后具有明显的结构变化。【结论】新型 *A. niger* 脂肪酶 *lipB* 基因的克隆不仅积累了脂肪酶基因资源, 而且为高效基因工程菌的构建及规模化应用奠定基础; 对 LipB 的酶学性质分析表明, 该酶在食品和油酯化工等领域具有广阔的应用前景。

关键词: 黑曲霉; 脂肪酶; *lipB*; 克隆; 表达

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1095-07

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是重要的工业用酶, 广泛应用于食品、油脂化工、洗涤以及医药等行业^[1-2]。作为黑曲霉(*Aspergillus niger*)的胞外分泌物, *A. niger* 脂肪酶具有良好的生物安全性, 被美国食品药品监督管理局认定为公认安全级(Generally Regarded As Safe, GRAS)。因此, *A. niger* 脂肪酶是食品工业中首选的脂肪酶品种^[3]。与其它微生物源的脂肪酶相比, *A. niger* 脂肪酶在最适 pH(pH < 7)和底物特异性等酶学性质上均具有特殊性。因此, 该类脂肪酶在前体药物的合成和手性化合物的拆分等领域也具有广阔的应用前景。但目前, *A. niger* 脂肪酶还未规模化生产, 从而限制了该类脂肪酶的应用。良好

的脂肪酶基因资源和脂肪酶高效表达的基因工程菌是获得脂肪酶规模化生产的重要前提。

目前, 部分 *A. niger* 脂肪酶已经被纯化并进行了酶学性质分析^[4-10]。然而, 由于菌株来源、培养条件以及检测条件等方面的差异, 所纯化的脂肪酶在分子量(31 ~ 65 kDa)和酶学性质(如最适 pH = 2.0 ~ 6.6)等方面具有非常大的差异, 很难单纯从酶学性质方面描述 *A. niger* 脂肪酶的酶谱。因此, 从“分子钟”水平(酶基因和氨基酸序列)来阐述 *A. niger* 脂肪酶将会更加准确, 且具有可比性。

本实验室通过脂肪酶纯化、N-端序列分析以及简并引物设计等手段成功地克隆了 *A. niger* F044

基金项目: 十一五“863 计划(2007AA05Z417, 2006AA020203)

作者简介: 杨江科(1972 -)男, 湖北天门人, 博士, 副教授, 主要从事工业酶及酶工程等领域的研究。Tel : + 86-27-87792214 ; Fax : + 86-27-87792213 ; E-mail : jiangke_yang@hotmail.com

收稿日期: 2009-02-07 ; 修回日期: 2009-05-09

的首个脂肪酶基因 *lipA*, 并实现了其在 *E. coli* 中的高效表达^[11]。为进一步丰富脂肪酶基因资源, 为 *A. niger* 脂肪酶基因工程菌的构建及酶的规模化制备奠定基础, 本研究在 *A. niger* 基因注释的基础上, 克隆了第二个新的 *A. niger* F044 脂肪酶基因 *lipB*, 并实现了其在 *E. coli* 中的高效表达。表达产物经纯化后, 对其底物特异性及动力学常数、最适温度、pH 和 Ca^{2+} 敏感性以及构象变化等酶学性质进行了系统的研究, 为该脂肪酶的工业化生产及应用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *A. niger* F044 为本实验室保存, 详见文献[11]。 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Pfu* 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒提取试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购自 Tiangen 公司。4-硝基苯磷酸二钠(pNPP-Na)、4-硝基苯乙酸酯(pNPA ,C2)、4-硝基苯丁酸酯(pNPB ,C4)、4-硝基苯辛酸酯(pNPC ,C8)、4-硝基苯癸酸酯(pNPC ,C10)、4-硝基苯月桂酸酯(pNPL ,C12)和 4-硝基苯棕榈酸酯(pNPP ,C16)购自 Sigma 公司。

1.2 基因克隆

以 *A. niger* F044 菌株总 DNA 为模板, 以上下游的保守序列为引物 P1(5'-CTCAAGAGTATCCTGC-ACTG-3')和 P2(5'-CTGAACCTTCCTGGGATAG-3'), 并通过 PCR 扩增了 *lipB* 基因的基因组片段(GenBank 登录号 :FJ536287)。以 pABNde(5'-CTCA-TATGGCTCCAGCACCTGCTCCGA-3' , *Nde* I site)和 pABEco(5'-CTGAATTCCTACGAGCATTCACTAAT-3' , *Eco*R I site)为引物通过 RT-PCR 扩增 *lipB* 基因的 cDNA 序列(GenBank 登录号 :FJ536288)。

试验以 *A. niger* F044 菌丝球为材料, 采用 Trizol 试剂盒(Gibcol)抽提总 RNA, 具体操作详见 Gibcol 公司产品说明。cDNA 第一链的合成采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas)试剂盒。PCR 体系为: 每 50 μ L 体系中包含 200 μ mol/L dNTP、0.1 mmol/L 引物、1.5 mmol/L $MgCl_2$ 、1 U *Taq* DNA 聚合酶。反应程序: 94 $^{\circ}C$ 变性 4 min, 94 $^{\circ}C$ 30 s, 56 $^{\circ}C$ 50 s, 72 $^{\circ}C$ 1 min, 共 30 循环, 72 $^{\circ}C$ 6 min。PCR 产物通过 A/T 克隆方式连接在 pMD18-T simple 载体(TaKaRa)构建成质粒 pMD-Lip。

插入片段由上海 Invitrogen 公司进行序列分析。

质粒 pMD-Lip 由 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切并连入同样经双酶切的 pET28-a 构建成 LipB 和载体中的 Hig-tag 融合表达的质粒 pET-Lip, 并经 $CaCl_2$ 介导转化入 *E. coli* BL21(DE3)。

1.3 脂肪酶的诱导表达与纯化

在 20 $^{\circ}C$ 下, 由 200 μ mol/L IPTG 诱导 *E. coli* (pET-Lip) 10 h 后, 离心收细菌体, 并用 1 \times PBS 缓冲液(pH = 7.4)悬浮菌体。菌体经超声波破碎和 DNase I 处理后, 离心获得含 His-tag-LipB 融合蛋白上清液。His-tag-LipB 融合蛋白经过 Ni-Agarose 柱(Amersham Inc.)纯化, 用 15% 的甘油保存备用。纯化蛋白通过 SDS-PAGE 电泳检测其分子量。

1.4 脂肪酶活测定和底物特异性分析

脂肪酶活的测定采用 pNPP 法^[12]。酶活单位定义为: 在 45 $^{\circ}C$ 条件下, 1 \times PBS(pH = 7.4)缓冲液中, 每分钟降解 1 μ mol 底物所需的酶量定义为 1 个单位(U)。反应动力学常数 K_m 值的测定: 底物 pNPC-C8、pNPC-C10 和 pNPL 的浓度分别为 1.25、2.5、5.0、10.0 和 20.0 μ mol/L。并通过一定量的脂肪酶测定其在该浓度下的酶活, 并通过双倒数作图, 求出 K_m 值。蛋白质的定量采用 Bradford 法, 并以牛血清白蛋白为标准。

1.5 温度、pH 和离子敏感性测定

脂肪酶最适温度、温度稳定性、最适 pH、 Ca^{2+} 依赖性测定依照文献[11, 13-14]进行。温度稳定性测定时, 将脂肪酶保育在一定温度下(40 $^{\circ}C$ 、50 $^{\circ}C$ 和 60 $^{\circ}C$) 1 h, 并检测其残余酶活。在 Ca^{2+} 和 EDTA 敏感性测定时, 将其保育在一定浓度溶液中 1 h, 并检测残余酶活。

1.6 多重比较及系统发育分析

反映 *A. niger* 脂肪酶及相近脂肪酶的系统发育关系的发育树在 MEGA3.1 软件的辅助下构建, 各数据的计算采用 Kimura 2-parameter 模型, 并通过邻接法(Neighbor-joining)计算^[15]。各序列间的多重比较在 BioEdit 软件(North Carolina State University)辅助下, 采用 Clustal W 程序进行。

1.7 圆二色光谱分析

圆二色光谱分析在日本 Jasco J-810 型光谱分析仪中进行。蛋白质样品缓冲液为磷酸缓冲液(pH 7.4), 样品浓度在 0.05 ~ 0.2 μ g/ μ L 范围内。比色池光径为 0.1 cm, 狭缝选择 1 nm。测量参数为: 温度 37 $^{\circ}C$, 分辨率 0.2 nm, 响应时间 0.25 s, 扫描速率 200 nm/min, 扫描波长范围为 200 nm ~ 300 nm, 每个

样品扫描 3 次。

2 结果

2.1 *lipB* 基因的克隆

根据基因注释,在 *A. niger* 1 号和 5 号染色体中存在着 2 个开放式阅读框(ORF)。对该编码序列的二级结构分析表明它们具有典型的脂肪酶特征,属于脂肪酶超家族成员(lipase superfamily)(图 1)。位于 5 号染色体上的 ORF 区段即为本室所克隆的首个脂肪酶基因 *lipA*^[11]。本研究以 *A. niger* 1 号染色体该 ORF 上下游保守区段为引物,通过 PCR 和 RT-PCR 扩增,分别获得了 *A. niger* F044 第二个脂

肪酶基因 *lipB* 的完整基因组序列和 cDNA 序列(GenBank 登录号:FJ536287、FJ536288)。所克隆的 *lipB* 基因包含 4 个外显和 3 个内含子。该基因 ORF 长为 897 bp,编码 298 氨基酸(图 1 和图 2-A)。

A. niger 脂肪酶 LipB 和已报道其它种属脂肪酶氨基酸序列的系统发育分析表明供试脂肪酶分为三群。所克隆的脂肪酶 LipB 与 LipA 在系统发育上共同聚在群 I,但其氨基酸序列相似性仅为 67%,且分别聚为不同的两个亚群。群 II 主要由其它种属的脂肪酶构成,群 III 由 *A. oryzae*、*A. fumigatus* 和 *P. allii* 的脂肪酶组成(图 2-B)。



图 1 A. F044 脂肪酶 LipB 和 *A. niger* CBS 513.88 相关序列的多重比较

Fig.1 Alignment of amino acid sequences of *A. niger* F044 lipases and the related sequences of *A. niger* CBS 513.88. F044 :*A. niger* F044 ; CBS :*A. niger* CBS 513.88. Putative amino acids of *A. niger* CBS 513.88 identical to LipB of *A. niger* F044 are plotted as dots. Solid boxes represent conserved nucleophilic penta-peptide motif (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly). (*) indicates the amino acid residues belonging to the catalytic triad (Ser-His-Asp), and (...) indicates amino acid residues belong to the "lid" domain.

2.2 LipB 诱导表达及纯化

脂肪酶 *lipB* 和 His-tag 组成融合蛋白经 IPTG 诱导后,表达产物经 Ni-agarose 柱纯化后,通过 SDS-PAGE 检测其分子量(图 3)。凝胶扫描结果表明, *lipB* 基因在 *E. coli* 中获得了高效表达,表达产物 LipB 约占总蛋白量的 40%。细胞裂解液的初始酶活约为 163 U/mg,经 Ni-agarose 纯化后,酶活达 1370 U/mg,酶活回收率约 12%。克隆的脂肪酶 LipB 大小约为 43.0 kDa,比理论预测的分子量 40.0 kDa 略大(His-tag 为 2 kDa)。

2.3 LipB 的底物特异性

本试验以具有不同碳链长度的 pNP 酯为底物,检测了 LipB 的底物特异性(图 4)。如图所示,LipB 的适宜底物为中碳链脂肪酸酯且底物范围较窄。其最适碳链长度为 C8, K_m 值为 5.98 mmol/L,但对 C10 和 C12 底物的酶活仅为 19.3% 和 38.6%, K_m 值分

别为 40.27 和 11.89 mmol/L(表 1)。该酶对 pNPP (C16)和 pNP-Na(酯酶的检测底物)的活力均较低(8.1%和 16.0%)。

2.4 LipB 对钙离子的依赖性

部分脂肪酶在其活性中心具有 Ca^{2+} 结合位点,表现为明显的 Ca^{2+} 依赖性,其活性受到 Ca^{2+} 和离子螯合剂的影响^[16]。为检测 LipB 对 Ca^{2+} 离子的依赖性,本研究将 LipB 用不同浓度(0.5、1.0 和 2.0 mmol/L)的 Ca^{2+} 离子处理 1 h 后检测其酶活(图 5-A)。如图所示,LipB 经 0.5 mmol/L 的 Ca^{2+} 处理后酶活即有显著的变化,当用 2 mmol/L Ca^{2+} 处理脂肪酶 1 h 后,酶活提高了 2.6 倍。EDTA 能抑制 LipB 的活性,当用 2 mmol/L EDTA 处理 1 h 后,残余酶活仅为 67.5%(图 5-B)。结果表明 *A. niger* LipB 活性中心具有 Ca^{2+} 离子结合位点,表现为明显的 Ca^{2+} 激活作用。

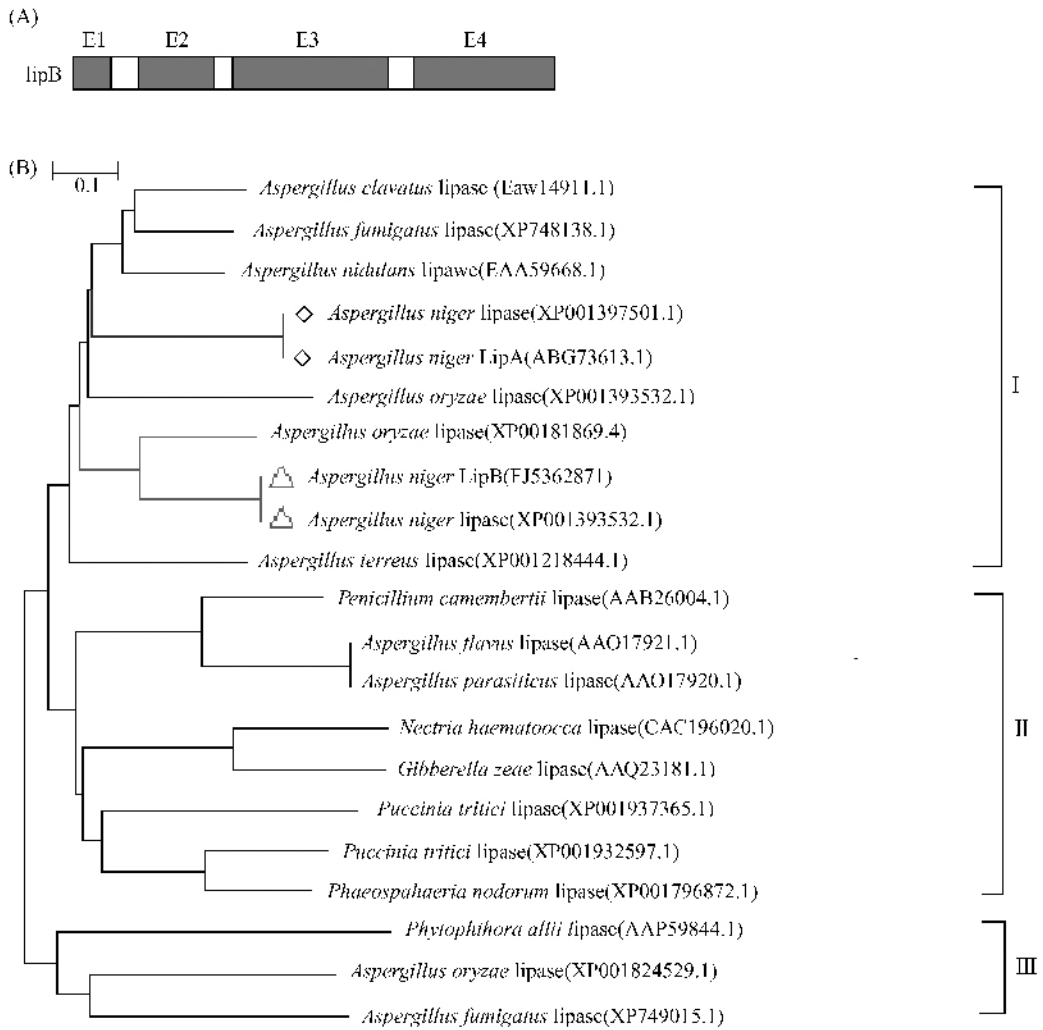


图2 *A. niger* 脂肪酶基因 lipB 的结构 (A) 及其与已报道相近种属脂肪酶的系统发育关系 (B)

Fig.2 Structure of *A. niger* lipB gene (A) and phylogeny analysis on amino acid sequence of *A. niger* lipases and the related (B). E1-E4 Exon of lipB.

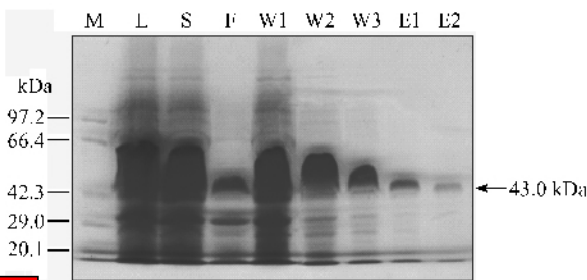


图3 LipB 基因表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of LipB expressed in *E. coli*. M:marker, L:cell lysate, S:supernatant, F:flow-through, W:washing, E:elution from Ni-agarose column specifically captured enzymes.

发生了显著的变化。这主要是由于 Ca^{2+} 诱导了蛋白质 α -螺旋的数目和位置的变化,以及由于 β -折叠的重构和增加(与 Ca^{2+} 结合形成活性中心), β -折叠峰(215 ~ 217 nm)增大后与 α -螺旋峰的重叠造成的。

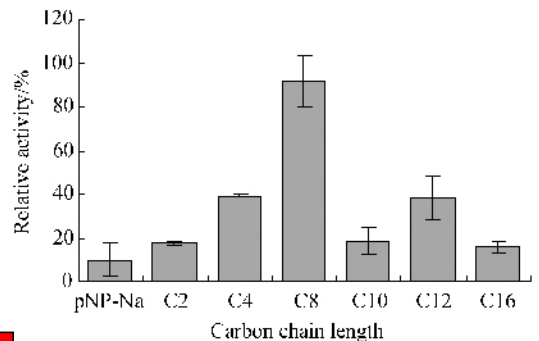


图4 脂肪酶 LipB 对不同碳链长度的底物的相对酶活

Fig.4 Activity of LipB toward different pNP ester substrates.

本研究通过圆二色光谱技术分析了 LipB 受 Ca^{2+} 激活前后的构象变化(图 6)。由图 6 可见,在波长 200 ~ 250 nm 的范围内 LipB 具有典型的 α -螺旋峰(208 nm 峰和 222 nm 峰)。经 Ca^{2+} 诱导后,光谱图

表 1 脂肪酶 LipB 对底物的特异性

Substrate	K_m (mmol/L)	V_{max} [$\mu\text{mol}/(\text{min mg})$]
C8	5.98	34.69
C10	40.27	164.47
C12	11.89	33.34

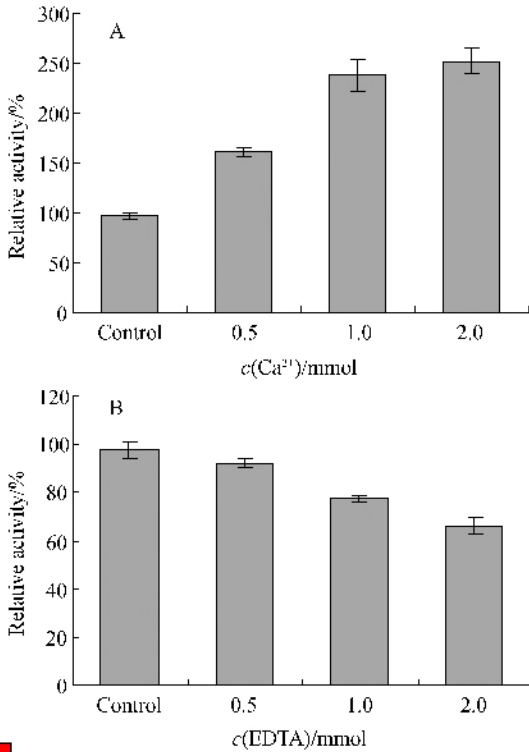


图 5 脂肪酶 LipB 在不同 Ca^{2+} (A) 和 EDTA (B) 浓度处理后的酶活

Fig.5 Activity of LipB incubated in different concentration of Ca^{2+} and EDTA solutions. A :Activity of lipase after incubated in Ca^{2+} solution for 1 h ; B :Activity of lipase after incubated in EDTA solution for 1 h.

3.5 LipB 具有一定的温度稳定性

本研究在不同 pH 条件下检测了脂肪酶的活性 (图 7)。由图可见, LipB 最适 pH 为 $\text{pH} = 6.0$, 在偏

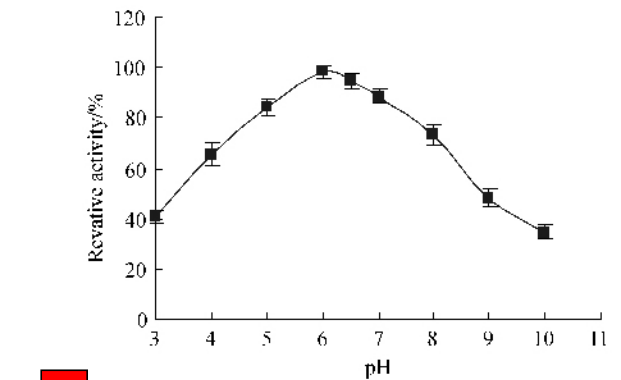
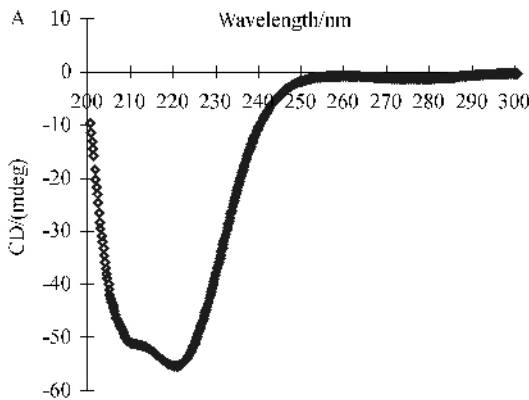


图 7 脂肪酶 LipB 在不同 pH 值下的酶活

Fig.7 Lipase activity checked under different pH value.

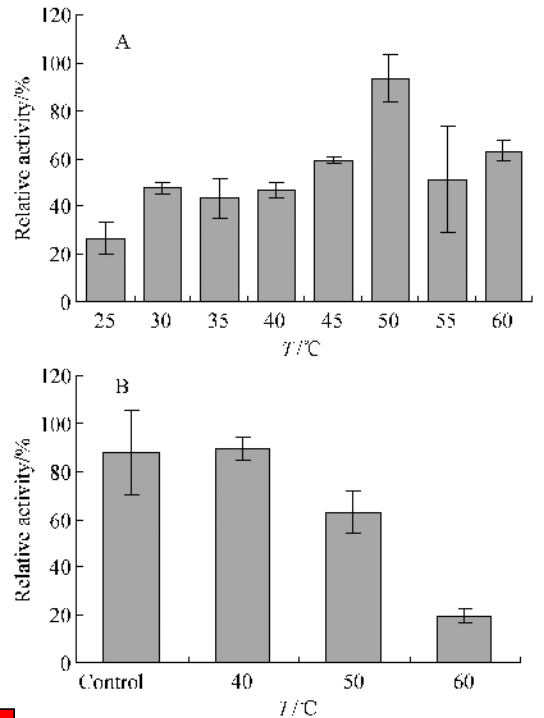


图 8 脂肪酶 LipB 的最适温度 (A) 及温度稳定性 (B) 测定

Fig.8 Optimal temperature (A) and temperature stability of LipB (B). A :Lipase activity checked under different temperature ; B :Remaining activity after incubated under different temperature for 1 h.

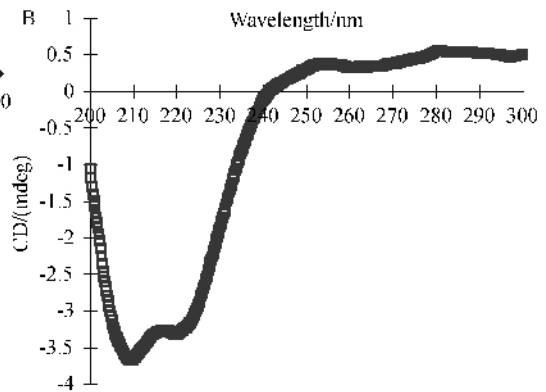


图 6 脂肪酶 LipB 在 Ca^{2+} 处理前 (A) 和处理后 (B) 的圆二色光谱图对比

Fig.6 Circular dichroism of LipB. A :Untreated by Ca^{2+} ; B :Treated by 2 mmol/L Ca^{2+} for 1 h.

酸的环境下,该酶能够保持较好的活性。当 pH > 9.0 时,酶活下降到最高酶活的 46.8%。

脂肪酶最适温度测定表明,在 25℃~60℃ 的范围由 LipB 的最适反应温度为 50℃(图 8-A)。LipB 具有一定的温度稳定性,当在 40℃ 下处理 1 h 后,脂肪酶活没有显著变化,但在 50℃ 处理 1 h 后,脂肪酶活为初始酶活的 63.6%,而在 60℃ 下仅为 18.8%(图 8-B)。本结果与 Hatzinikolaou 等^[7]报道(在 40℃ 下稳定)相一致,但比 Sugihara 等^[6]报道的脂肪酶(最适温度为 30~37℃)更稳定。

3 讨论

作为传统的工业用酶,目前已有多个 *A. niger* 脂肪酶被纯化,并对之进行了酶学性质研究^[4-10]。然而,由于菌株来源,培养方式以及实验条件的差别,不同研究者所纯化的 *A. niger* 脂肪酶很难进行相互比较。据文献记载^[4-6],*A. niger* 分泌物中可能包含 3 种脂肪酶,其大小分别为 35.0、35.0 和 47.8 kDa,且在底物特异性等酶学性质方面存在区别;另据 Pokorny 和 Fernández-Lorente 等^[8,17]研究,*A. niger* 菌株中可能存在分子量分别为 31 kDa、43 kDa 和 65 kDa 的 3 种脂肪酶。综合上述文献,仅能初步判断 *A. niger* 中存在多种脂肪酶,且酶学性质具有较大的差异。为克服这一现状,在克隆了首个 *A. niger* 脂肪酶基因 *lipA* 的基础上^[11],本研究成功地克隆了第二个 *A. niger* 新型脂肪酶基因 *lipB*,该酶与 *lipA* 的氨基酸相似性仅为 67%。本研究所获得的脂肪酶在酶学性质上均有别于已报道的脂肪酶。尽管 LipB 的分子量与 Pokorny 等^[8]所纯化的脂肪酶相近(约 43 kDa),但在最适 pH(pH6.0 和 7.0)底物特异性(C8 和 C10)等性质上均有明显的区别。

目前,商品化 *A. niger* 脂肪酶均为包含多种脂肪酶和其它杂蛋白的粗制品且目前研究获得的工艺参数均为多种酶共同作用的结果,准确度低。表达单一脂肪酶的基因工程菌可有效地获得脂肪酶的纯品,且制备效率高。本研究基于 *A. niger* 基因注释等生物信息学手段,通过 PCR 和 RT-PCR 克隆了新的 *A. niger* 脂肪酶基因,并实现了其在 *E. coli* 中的高效表达。该酶在酸性环境中良好的水解能力,表明该酶可应用于食品行业中特殊油酯类物质的水解,以及食品风味改良^[1-10]。同时,LipB 所表现出的对辛酸酯类(C8)等中等碳链长度底物的良好适应性极大地拓展了其在油脂化学特别是结构性脂质合成中的应用领域^[2,18]。脂肪酶 *lipB* 基因的克隆不

仅积累了脂肪酶基因资源,而且为高效基因工程菌的构建及规模化应用奠定基础;对 LipB 的酶学性质分析表明该酶在食品、医药和油酯化工等领域具有广阔的应用前景。

致谢 感谢华中科技大学严翔翔、江雪青、叶才伟在实验中所提供的帮助。感谢华中科技大学分析测试中心在圆二色光谱分析中提供的帮助。

参考文献

- [1] Sarlyar L, Heparan D. The role of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* in the hydrolysis of hazelnut fat. *International Journal of Food Science & Technology*, 2003, 6: 487-492.
- [2] Turner C, Wani S, Wong R, et al. Lipase-catalyzed esterification of 2-monoricinolein for 1,2(2,3)-diricinolein synthesis. *Lipids* 2006 41(1): 77-83.
- [3] Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad J, et al. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002 59: 426-435.
- [4] Fukumoto J, Iwai M, Tsujisaka Y. Studies on lipase. 1. purification and crystallization of lipase secreted by *Aspergillus niger*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 1963 9: 353-361.
- [5] Tombs MP, Blake GG. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1982, 700: 81-89.
- [6] Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. *Agricultural Biology and Chemistry*, 1988 52: 1591-1592.
- [7] Hatzinikolaou DG, Macris JB, Christakopoulos P. Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 1996 5: 547-552.
- [8] Pokorny D, Cimerman A, Steiner W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A1 16 strain. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1997 2: 215-222.
- [9] Namboodiri VM, Chattopadhyaya R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids* 2000 35: 495-502.
- [10] Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale DV. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology* 2009 100: 1486-1490.
- [11] Shu ZY, Yang JK, Yan YJ. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. *Chinese Journal of Biotechnology* 2007 23: 96-100.

- [12] Teng Y, Xu Y. A modified para-nitrophenyl palmitate assay for lipase synthetic activity determination in organic solvent. *Analytical Biochemistry* 2007 363: 297 – 299.
- [13] Yan J, Yang J, Xu L. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2007 49: 28 – 35.
- [14] Yang J, Guo D, Yan Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2007 45: 91 – 96.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1980, 16: 111 – 120.
- [16] Yang J, Zhang B, Yan Y. Cloning and expression of *Pseudomonas fluorescens* 26-2 lipase gene in *Pichia pastoris* and characterizing for transesterification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, (DOI 10.1007/s12010-008-8419-5).
- [17] Fernández-Lorente G, Ortiz C, Segura RL, et al. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering* 2005 92: 773 – 779.
- [18] Turner C, He X, Nguyen T. Lipase-catalyzed methanolysis of triricinolein in organic solvent to produce 1,2-(2,3)-diricinolein. *Lipids* 2003 38(11): 197 – 206.

Cloning, expression and characterization of a novel lipase gene *lipB* from *Aspergillus niger* F044

Jiangke Yang* , Zhengping Zhang , Liyin Liu , Yunjun Yan

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

Abstract [Objective] We cloned, expressed and characterized a novel lipase gene *lipB* from *Aspergillus niger* F044, to facilitate the large scale production and application of that enzyme. **[Method]** We cloned *lipB* gene and the cDNA sequence by PCR and RT-PCR, and then cloned the open reading frame of *lipB* into pET28a vector and expressed by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. After Ni-agarose purification, the characteristics were determined and the conformation change was checked by circular dichroism methods. **[Results]** The novel lipase genes cDNA of *lipB* were cloned from *Aspergillus niger* F044 (GenBank: FJ536287, FJ536288) and expressed in *Escherichia coli*. The molecular weight of LipB was about 43 kDa. The optimal substrate of this enzyme is 4-nitrophenyl octanoate (pNPC-C8) with $K_m = 5.98$ mmol/L. The optimal temperature and pH was 50°C and pH 6.0. The enzyme was stable below 40°C. After incubated at 60°C for 1 h, only 18.8% activity remained. After treated by 2 mmol/L Ca^{2+} for 1 h, the activity improved 2.6-fold. **[Conclusion]** Enzymatic characteristics of LipB determined showed this enzyme might have potential in industrial applications.

Keywords : *Aspergillus niger* ; Lipase ; *lipB* ; cloning ; expression

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)