

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(2):236-243; 4 February 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 碱性脂肪酶 LpsA2 的表达和酶学性质分析

王宝娟, 苏蕊蕊, 汪劼, 朱国萍*

(安徽师范大学生命科学学院, 重要生物资源保护与利用安徽省重点实验室, 芜湖 241000)

摘要:【目的】本研究将推测的阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 脂肪酶基因 *lpsA2* 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行异源表达及系统的酶学性质分析。【方法】提取阿维链霉菌基因组, 设计特异性引物, PCR 扩增脂肪酶基因 *lpsA2*, 使其在大肠杆菌中异源表达, 利用 6 个组氨酸标签纯化脂肪酶 LpsA2, 并进行酶学性质分析; 对 LpsA2 进行序列比对和进化分析。【结果】氨基酸序列比对显示 LpsA2 具有脂肪酶典型的由 Ser、His 和 Asp 构成的活性部位, 即 Ser¹³⁰-Asp²²¹-His²⁵, 其中 Ser 位于保守的五肽结构 (Gly¹²⁸-His¹²⁹-Ser¹³⁰-Gln¹³¹-Gly¹³²) 中; 分子系统学分析显示, LpsA2 是脂肪酶第一家族亚家族成员 (Subfamily I.7); 实验测得纯化的重组脂肪酶 LpsA2 的最适反应 pH 为 8.0, 最适反应温度为 50℃; 最适底物为对硝基苯酚豆蔻酸酯; 在 10℃ - 50℃ 范围内该酶的激活自由能为 6.3 kcal/mol; 1 mmol/L Co²⁺、Hg²⁺、Zn²⁺ 可使酶活性提高至 250% 以上; 15% 的二甲基甲酰胺和二甲基亚砷使酶活分别提高至 110.7% 和 138%; 0.1% 和 1% 的 Span-20 可使酶活性分别提高至 352.7% 和 189.7%。【结论】本研究对推测的来源于 *S. avermitilis* 的脂肪酶基因 *lpsA2* 进行了异源表达和酶学功能鉴定, 不仅为脂肪酶的研究积累了更多数据, 也为具有优良性能的脂肪酶生物工程菌的筛选奠定了基础, 更为其在食品加工、药物合成等工业生产中的应用提供了依据。

关键词: 脂肪酶; 阿维链霉菌; LpsA2; 表达; 进化树

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 02-0236-08

脂肪酶 (Lipase) 是催化酰基甘油酯水解为脂肪酸和甘油的一类酶, 主要包括羧酸酯酶 (carboxylesterases, EC 3.1.1.1) 和真脂肪酶 (“true” lipases, EC 3.1.1.3)^[1]。羧酸酯酶能够水解或者合成酰基链长度小于 10 的甘油酯类, 以三丁酸甘油酯为标准底物, 而真脂肪酶一般以酰基链长度大于等于 10 个碳原子的甘油酯为底物, 三油酸甘油酯为其标准底物, 不过大多数真脂肪酶也能水解羧酸酯酶的底物。脂肪酶属于 α/β 水解酶超家族, 具有由

Ser、His 和 Asp 构成的典型活性部位, 其中 Ser 通常位于保守的 Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly 五肽结构中^[2-3]。依据脂肪酶氨基酸序列的同源性和部分生化特征, Jaeger 将细菌脂肪酶分为八大家族, 包括真脂肪酶 (Family I)、包含 Gly-Asp-Ser-(Leu) 模体 (motif) 的脂肪酶家族 (GDSDL family 或 Family II)、Family III、激素敏感性脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL family 或 Family IV) 以及 Family V、VI、VII 和 VIII, 其中 Family I 又包括 7 个亚族 (Subfamily I.1-

基金项目: 国家自然科学基金 (30500300; 30870062); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-06-0558); 教育部回国留学人员启动基金; 安徽省优秀青年科技基金 (06043089); 生物环境与生态安全安徽省高校重点实验室资助

* 通信作者。Tel: +86-553-3883592; E-mail: gpz1996@yahoo.com

作者简介: 王宝娟 (1979 -), 女, 安徽砀山人, 讲师, 博士研究生, 主要从事微生物与分子酶学方面的工作。E-mail: wangbaojuan01@sohu.com

收稿日期: 2009-09-12; **修回日期:** 2009-10-09

1.7)^[2,4]。脂肪酶作为一种重要的工业用酶,已被广泛应用于医药合成、纺织化工、食品加工、环境治理、生物柴油合成等领域。

链霉菌 (*Streptomyces*) 是一类存在于土壤中的好氧、丝状、产孢子的革兰氏阳性细菌,次级代谢丰富,可以产生大量的具有重要价值的次级代谢物,如抗生素、酶抑制剂、除草剂和抗肿瘤药物等,工业用途十分广泛^[5]。脂肪酶在链霉菌中普遍存在且含量丰富^[6],但目前只有极少数的链霉菌脂肪酶基因被表达和鉴定^[7-9]。截止到2008年4月,GenBank 中有约27000种基因功能注释为脂肪酶/酯酶。虽然链霉菌可以产生很多的脂肪酶/酯酶,但已经进行功能鉴定的很少^[10]。已知天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) A3(2) 和阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) MA4680 分别含有31种和20种推测的酯酶/脂肪酶^[10-12],已进行酶学性质分析的研究报道并不多。本文依据 GenBank 中已报道的阿维链霉菌基因组序列,首次从基因组中扩增和克隆了脂肪酶基因 *lpsA2* (GenBank: BAC74270),并对纯化的 LpsA2 进行了酶学性质鉴定,以及通过氨基酸序列比对,构建了进化树,对该脂肪酶进行了分子系统学分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:阿维链霉菌 CGMCC4.1253 购自中国科学院微生物菌种保藏管理中心; *E. coli* DH5 α 为本室实验室保存;表达载体 pET-28b(+) 及宿主菌 *E. coli* Rosetta(DE3) 由中国科学技术大学合肥微尺度物质科学国家实验室周丛照教授惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶 *Nde*I、*Xho*I 以及 T₄DNA 连接酶购于 MBI 公司;高保真酶 PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase 购于 TaKaRa 公司;基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 凝胶抽提试剂盒为 Promega 公司产品;DNA 分子量标准为北京天根公司产品;蛋白质分子量标准为 BBI 公司产品,蛋白质纯化试剂使用 Clontech 公司的 TALONq[®] Purification Kit 及 TALON[®] Metal Affinity Resin (主要成分为 Co²⁺ 离子螯合琼脂糖凝胶)、蛋白质浓度测定使用 Bio-Rad 公司的 Quick Start Bradford 蛋白测定试剂盒;苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、对硝基苯酚 (*p*-nitrophenol),对硝基苯酚奎酸酯 (*p*-nitrophenyl caprate, *p*NPC10)、对硝基苯酚棕榈酸酯

(*p*-nitrophenyl palmitate, *p*NPP16) 购自 Sigma 公司;对硝基苯酚辛酸酯 (*p*-nitrophenyl caprylate, *p*NPC8) 购自 Alfa Aesar 公司;对硝基苯酚月桂酸酯 (*p*-nitrophenyl laurate, *p*NPL12)、对硝基苯酚豆蔻酸酯 (*p*-nitrophenyl myristate, *p*NPM14) 购自 Fluka 公司,其它常规试剂采用进口分装或国产分析纯。PCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统均采用 Bio-Rad 公司产品。

1.2 链霉菌的培养及基因组 DNA 的提取

将购买的阿维链霉菌 CGMCC4.1253 菌株进行活化后,菌株的孢子稀释液涂布于 R₂YE 培养基,28℃ 培养 4-6 天,挑取单菌落孢子转入 YEME 液体培养基中^[13],振荡培养过夜,形成菌丝球后,6000 × g 冷冻离心 8 min,收集菌丝体。链霉菌基因组 DNA 采用基因组提取试剂盒直接抽提。

1.3 序列分析

脂肪酶基因 *lpsA2* 的 GC 含量分析采用 DNASTar 软件,蛋白质分子量及等电点预测采用 Compute pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html),氨基酸序列一致性分析采用 PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),进化树分析使用 MEGALIGN 4.1 软件,CLUSTAL X 1.83 分析其同源性。

1.4 脂肪酶基因 *lpsA2* 的克隆和表达载体的构建

根据 *S. avermitilis* 基因组中的 *lpsA2* 基因序列设计一对引物,正向引物为 5'-TCTGAGC CATATGCTGCCCTGGAAACGAGT-T-3',反向引物为 5'-ATACTCGAGGCACCACCGCTGAGGACTCCG-3' (下划线处分别为 *Nde*I 和 *Xho*I 酶切位点)。以阿维链霉菌 CGMCC4.1253 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *lpsA2* 全序列。PCR 循环参数为:94℃,4 min;98℃,10 s;58℃,15 s;72℃,1 min 20 s,循环 35 次;72℃ 充分延伸 8 min。对目的基因及载体 pET-28b(+) 进行 *Nde*I 和 *Xho*I 双酶切,纯化酶切产物后于 16℃ 连接 15 h,连接液转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 。挑选阳性克隆,并送上海生工测序鉴定。

1.5 重组脂肪酶的表达与纯化

将测序正确的重组表达质粒 pET-*lpsA2* 克隆转化感受态 *E. coli* Rosetta (DE3),挑选单菌落,37℃ 培养过夜,次日按 2% 接种量转接到 50 mL 含 50 μ g/mL 卡那霉素和 30 μ g/mL 氯霉素的 LB 液体培养基中,继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,20℃ 继续培养 15 h。4℃ 离心收集菌体,悬浮于破碎缓冲液中,超声破碎细胞(破

碎 12 s, 间隔 20 s, 共破碎 6 min)。细胞裂解液于 12000 r/min 离心 20 min, 所得上清液用 Co^{2+} 离子螯合琼脂糖凝胶柱进行纯化, 按说明书操作。利用 12% SDS-PAGE 鉴定 LpsA2 的纯化效果。

1.6 脂肪酶水解活力和蛋白质浓度的测定

脂肪酶的酶活测定采用对硝基苯酚法: 反应体系总体积为 1 mL, 反应液包含 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、1% 乙腈和 0.5 mmol/L 的 *p*NPM14。使用可以自动控温的 Cary 300 UV 分光光度计(美国 VARIAN 公司), 在 37°C 条件下反应 3 min 检测 *p*-NP 的生成, 检测波长为 410 nm。一个酶活单位(U) 定义为每分钟从对硝基苯酚酯(*p*-NP esters) 催化产生 1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。蛋白质浓度的测定使用 BIO-RAD 公司的试剂盒, 以牛血清白蛋白为标准。

1.7 酶学性质分析

1.7.1 pH 对酶的影响: 在不同 pH 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 6.0 - 10.0) 中, 37°C 测定酶活, 以酶活力最高点的相对酶活力为 100%, 确定最适反应 pH。

1.7.2 温度对酶的影响: 在 10°C - 60°C 之间测定酶活力, 规定酶活最高点的相对酶活力为 100%, 确定酶的最适反应温度。将酶在 37°C 和 50°C 条件下热处理一段时间后, 立即置于冰上冷却, 测定残余酶活力, 处理前的酶活力设为 100%, 确定酶的热稳定性。

1.7.3 底物特异性: 分别以不同链长的对硝基苯酚酯(C8-C16) 为底物, 在标准反应体系下检测酶活力, 以 *p*NPM14 的酶活力为 100%。

1.7.4 金属离子及其它试剂对酶的影响: 分别将终浓度为 1 mmol/L 和 10 mmol/L 的金属离子和酯酶混匀后于冰上孵育 30 min, 所用缓冲液为终浓度 50 mmol/L 的 Tris-HCl, 测定酶活力。处理前的酶活力设为 100%。

1.7.5 有机溶剂、去垢剂对酶的影响: 将有机溶剂甲醇(methanol)、乙腈(acetonitrile)、异丙醇(isopropanol)、二甲基甲酰胺(dimethylformamide, DMF)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO) 及去垢剂十六烷基三甲基溴化铵(cetyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)、斯潘-20(span-20)、吐温-20(tween-20)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS) 分别和酯酶混匀后于冰上孵育 30 min, 测定酶活力。处理前的酶活力设为 100%。

2 结果

2.1 序列分析

脂肪酶 *lpsA2* 基因全长 861 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, GC 含量为 68.41%, 特别是其密码子第三位的 GC 含量高达 92.4%, 体现了链霉菌基因的高 GC 含量特征。编码 286 个氨基酸, 预测分子量为 30.158 kDa, 等电点为 6.01。将 *LpsA2* 在 NCBI 的非冗余蛋白质数据库(non-redundant protein sequences) 进行 PSI-BLAST 分析, 结果表明 *LpsA2* 具有一个保守的脂肪酶功能域, 与众多脂肪酶/酯酶的氨基酸序列具有很高的相似性, 如与来自 *Streptomyces* sp. Mg1 (EDX27115)、*Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672 (ABYA01000458) 和 *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 (ABYX01000062) 中推测的分泌型脂肪酶(putative secreted lipase) 分别具有 80%、77% 和 76% 的氨基酸序列一致性。

采用代表 8 个不同家族的细菌脂肪酶序列与 *LpsA2* 序列一起构建进化树^[2, 4], 在分子进化树上 *LpsA2* 与 Family I 家族亲缘关系最近。进一步对 Family I 家族 7 个亚家族的 28 个成员进行进化树分析, 结果表明 *LpsA2* 与 Subfamily I.7 聚在同一进化枝上, 说明两者的亲缘关系最近(图 1)。*LpsA2* 与 Subfamily I.7 成员的氨基酸序列比对结果显示(图 2), *LpsA2* 具有脂肪酶典型的催化中心, 即 Ser¹³⁰-Asp²²¹-His²⁵³, 其中的 Ser 位于保守的五肽结构 Gly¹²⁸-His¹²⁹-Ser¹³⁰-Gln¹³¹-Gly¹³² 中。

2.2 表达质粒的鉴定及 *LpsA2* 的表达与纯化

包含 *lpsA2* 基因的表达质粒 pET-*lpsA2* 经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后产生两条带: 一条是 pET-28b (+) 载体片断, 大小约 5.3 kb; 另一条为 *lpsA2* 基因片段, 约 870 bp (如图 3-A)。将重组表达质粒 pET-*lpsA2* 转化感受态 *E. coli* Rosetta (DE3), 20°C 进行 IPTG 诱导表达。12% 的 SDS-PAGE 结果显示, 在 25 kDa 和 35 kDa 之间有明显的表达产物, 分子量约 30 kDa, 与 *LpsA2* 的理论计算值相近(如图 3-B)。

2.3 最适反应 pH、最适反应温度、热稳定性及活化能

以 0.5 mmol/L 的 *p*NPM14 为底物, 在标准条件下测定酶活力, 测得 *LpsA2* 的最适反应 pH 值为 8.0, 在 pH 7 - 9 范围内维持 50% 以上的活性, 在 pH 7.5 - 8.5 范围内仍能维持 85% 以上的活性(图 4-A)。在 pH 8.0 条件下, 在不同温度测定酶活力,

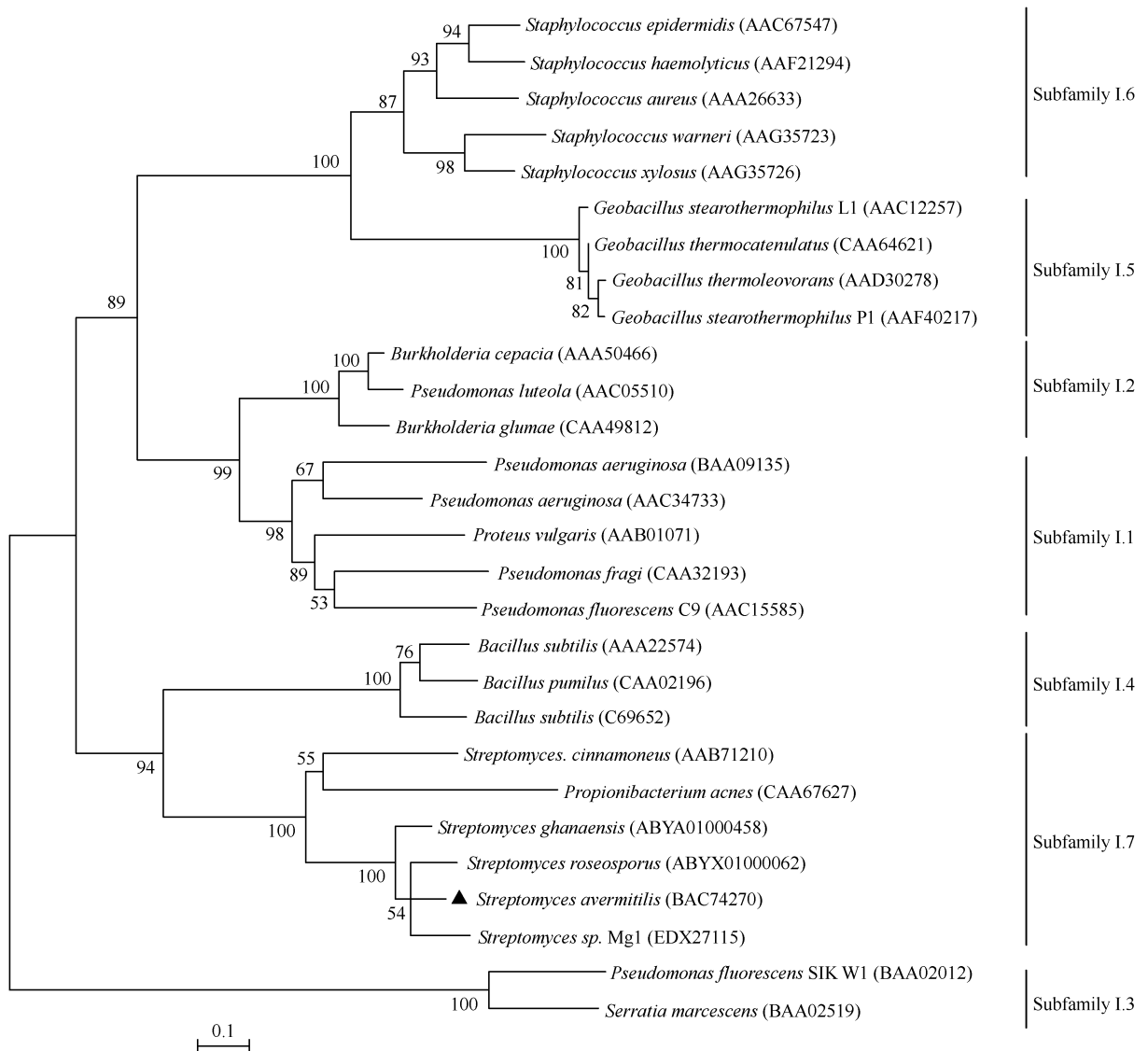


图 1 利用邻位相连法 (Neighbor-joining) 对包括 LpsA2 (▲) 的 28 个 Family I 家族成员的系统发生分析

Fig. 1 Unrooted neighbor-joining phylogenetic tree of LpsA2 (▲) and other 28 members of Family I. The tree was created by the program MEGALIGN version 4.1. Analysis was bootstrapped and bootstrap values higher than 53 were indicated at respective nodes (1000 replications).

结果表明 LpsA2 具有较宽的酶反应温度,其最适反应温度为 50℃,在 40℃ 到 60℃ 之间可维持 77% 以上的活性(图 4-B)。在 pH 8.0 和 50℃ 条件下,该酶的比活力是 17.1 U/mg。

在热稳定性方面:LpsA2 在 37℃ 温育 5 min 后,酶活剩余 84%,温育 65 min 后,酶活剩余 60%,有趣的是在 275 min 后,LpsA2 仍有 39% 的酶活;在 50℃ 时,虽然 LpsA2 温育 3 min 后酶活只剩余 55%,但是温育 14 min 后,酶活仍剩余 54%,23 min 后达到半衰期,温育 68 min 后,酶活仍剩余 20% (图 4-C)。根据阿伦尼乌斯方程 (Arrhenius plot) 在 10℃ 到 50℃ 范围内,以 *p*NPM14 作为底物时,LpsA2 的激活自由能是 6.3 kcal/mol (图 4-D)。

2.4 底物特异性

在 37℃、pH 8.0 条件下,测定 LpsA2 对不同链长的对硝基苯酚酯 (C8 - C16) 的底物特异性,结果表明它的最适底物是 *p*NPM14。LpsA2 对底物 *p*NPC8 的活性最低,仅为前者的 34% (图 5)。

2.5 金属离子和 PMSF 对酶活性的影响

在所有被检测的金属离子中,当浓度为 1 mmol/L 时:Co²⁺、Zn²⁺、Hg²⁺ 能明显增强酶的催化活力,残余活力约是原来的 250% 或更高(表 1);Ca²⁺ 对酶活影响不明显;K⁺、Na⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ 对酶活有一定程度的抑制作用。当浓度为 10 mmol/L 时:Ca²⁺ 对酶有激活作用,残余酶活为 129.2%;K⁺、Na⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Ni²⁺、Hg²⁺ 抑制酶

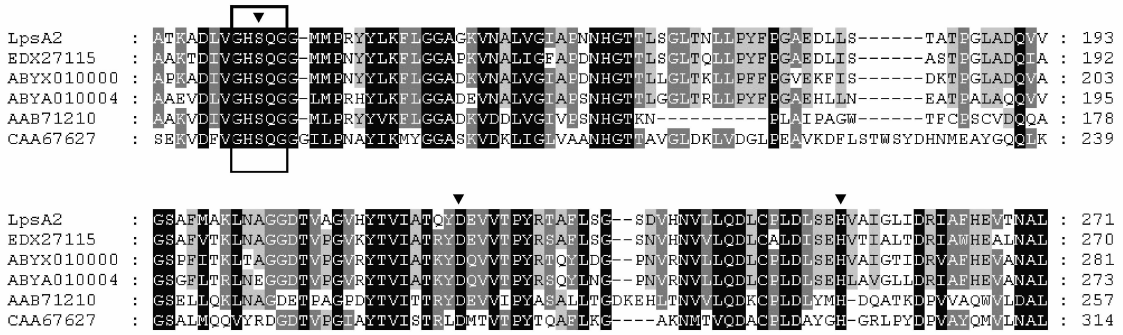


图2 LpsA2与Subfamily I.7亚家族成员的保守氨基酸序列的比对

Fig.2 Alignment of conserved amino acid sequence between LpsA2 and representative members of Subfamily I.7. Sequence alignment was performed using Clustal X version 1.83. Residues involved in catalytic triad were represented as filled circles (▼). These sequences share a conserved motif, Gly-His-Ser-Gln-Gly, containing a serine residue located at the putative active site (black box). The aligned sequences are from the following organisms: LpsA2, *Streptomyces avermitilis*; EDX27115, *Streptomyces* sp. Mg1; ZP_04707347, *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379; ZP_04689144, *Streptomyces ghanaensis* ATCC 14672; AAB71210, *Streptomyces cinnamoneus*; CAA67627, *Propionibacterium acnes* SK137.

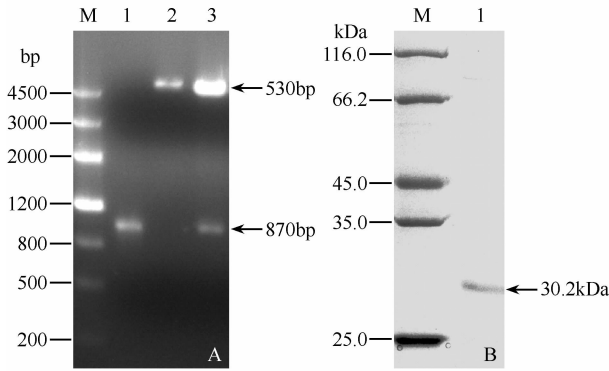


图3 表达质粒 pET-lpsA2 的酶切鉴定 (A) 及重组 LpsA2 的 SDS-PAGE 分析 (B)

Fig.3 Identification of the recombinant plasmid pET-lpsA2 by restriction digestion (A) and analysis of purified recombinant LpsA2 by SDS-PAGE(B). (A) M. DNA Marker III; 1. PCR product of lpsA2 gene; 2. pET-28b(+) was digested by Nde I; 3. pET-lpsA2 was digested by Nde I and Xho I. (B) M. Protein molecular weight standard; 1. Purified recombinant lipase LpsA2.

活,残余酶活介于30% - 80%之间;Mn²⁺、Zn²⁺强烈抑制酶活,残余酶活分别只有13.5%和26.9%;Co²⁺则使酶活性完全丧失。1 mmol/L和10 mmol/L的EDTA对酶活均无明显作用。1 mmol/L的PMSF使LpsA2活力下降30%,而10 mmol/L的PMSF则完全抑制酶活性。

2.6 有机溶剂和去垢剂对LpsA2活性的影响

当有机溶剂的含量为15%时,DMF、DMSO对酶活有一定程度的激活作用,残余活力分别为原来的110.7%和138.0%,而甲醇、乙腈、异丙醇对酶活有抑制作用(表2)。当有机溶剂的含量提高至30%时,甲醇、乙腈、DMSO会抑制酶活,残余活力分别为

61.4%、55.4%、75.9%,而异丙醇强烈抑制酶活,残余活力只有原来的27.8%。

在4种去垢剂中,0.1%和1%的Span-20是LpsA2的强烈激活剂,使酶活分别升高至原来的352.7%和189.7%,而其余去垢剂均抑制酶活,尤其是SDS和1%的CTAB、Tween-20使酶活性完全丧失(表3)。

表1 金属离子和PMSF对LpsA2活性的影响

Table 1 Effects of various metal ions and PMSF on the activity of LpsA2

Compounds	Relative activity(% ± s)	
	1 mmol/L	10 mmol/L
K ⁺ (KCl)	64.3 ± 0.4	80.4 ± 0.6
Na ⁺ (NaCl)	67.0 ± 0.9	72.7 ± 0.5
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	102.9 ± 2.3	129.2 ± 1.4
Co ²⁺ (CoCl ₂)	275.9 ± 6.6	0
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	44.4 ± 1.9	41.4 ± 0.7
Hg ²⁺ (HgCl ₂)	248.9 ± 6.6	34.1 ± 1.9
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	71.7 ± 0.8	82.4 ± 1.6
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	69.5 ± 3.2	13.5 ± 1.3
Ni ²⁺ (NiSO ₄)	79.2 ± 0.8	44.2 ± 3.1
Zn ²⁺ (ZnSO ₄)	296.8 ± 8.0	26.9 ± 1.3
EDTA	90.0 ± 2.5	70.4 ± 0.8
PMSF	69.8 ± 1.8	0

表2 有机溶剂对LpsA2活性的影响

Table 2 Effects of organic solvents on LpsA2 activity

Organic solvents	Relative activity(% ± s)	
	15%	30%
methanol	78.1 ± 1.9	61.4 ± 3.6
acetonitrile	56.7 ± 2.1	55.4 ± 3.6
isopropanol	52.1 ± 1.4	27.8 ± 2.6
DMF	110.7 ± 0.4	101.9 ± 2.0
DMSO	138.0 ± 5.3	75.9 ± 2.4

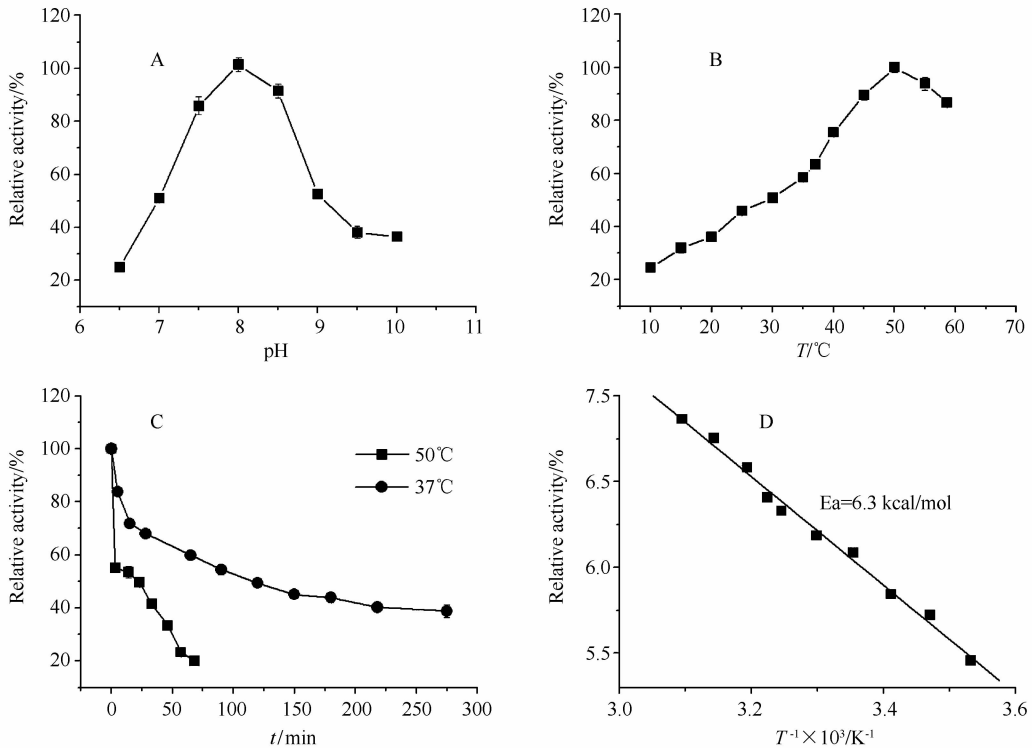


图 4 温度和 pH 对重组脂肪酶 LpsA2 活性的影响

Fig. 4 Effects of pH and temperature on the recombinant lipase LpsA2 activity. A. Effects of pH on enzyme activity. B. Effects of temperature on enzyme activity. C. Thermal stability of the enzyme. D. Activation energy calculated for LpsA2. The values were means of three independent experiments.

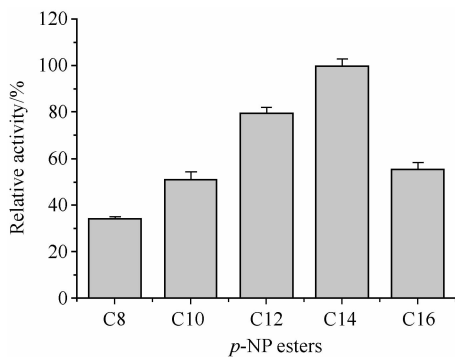


图 5 重组脂肪酶 LpsA2 的底物特异性

Fig. 5 Substrate specificity of the recombinant lipase LpsA2.

表 3 去垢剂对 LpsA2 活性的影响

Table 3 Effects of detergents on LpsA2 activity

Detergents	Relative activity (% \pm s)	
	0.1%	1%
CTAB	44.3 \pm 2.2	0
Span-20	352.7 \pm 11.0	189.7 \pm 4.5
Tween-20	20.6 \pm 1.4	0
SDS	0	0

3 讨论

来自阿维链霉菌的脂肪酶基因之间的序列一致

性非常低,甚至远低于大多数来自不同物种的同一家族脂肪酶基因之间的序列一致性。迄今的研究显示,链霉菌的酯酶/脂肪酶主要归在 Family I、GDSLfamily (Family II)、Family III、HSL family (Family IV)、Family VII 和 VIII^[2,4,10]。其中只有来自 *Streptomyces cinnamoneus* 的脂肪酶 LipA 和 *Propionibacterium acnes* 的 GehA 属于 Subfamily I.7 亚家族(曾经认为它们属于 Subfamily I.6 亚家族成员)^[2,4],而其它链霉菌的酯酶/脂肪酶都不属于 Subfamily I.7 亚家族成员。序列相似性搜索和进化树分析表明,LpsA2 与 Subfamily I.7 有着非常近的亲缘关系,为该亚家族的新成员。在阿维链霉菌推测的另外 19 个脂肪酶基因中,与脂肪酶基因 *lpsA2* (SAV6559)一致性最高的为 *lpsA1* (SAV7089),但是两者之间的序列一致性仅为 31%。鉴于 LpsA2 所处的特殊的系统进化位置,我们选取 LpsA2 进行研究。

氨基酸序列比对表明,Subfamily I.7 亚家族具有脂肪酶典型的 Ser-Asp-His 催化中心,,且 Ser 位于保守的 Gly-His-Ser-Gln-Gly 五肽结构内。但在生化特征方面,该亚家族成员之间却差异极大。如 LpsA2 的最适反应 pH 为 8.0,而 GehA 的最适反应 pH 为 7.0;LpsA2 的最适反应温度为 50°C,而 GehA

的最适反应温度为 37℃^[14]; LpsA2 的最适底物是 pNPM14, GehA 的最适底物为对硝基苯酚酯^[14], 而 LipA 的底物偏好 C-6 和 C-18 的三酸甘油酯^[8]; 在丝氨酸抑制剂方面, PMSF 使 LpsA2 完全丧失酶活, 而对 GehA 无影响^[14]。

酶的活化能 (E_a) 反映酶的催化效率。一般来源于嗜温微生物酶的 E_a 值要高于来自嗜冷微生物酶的 E_a 值^[15, 16], 如嗜温细菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的酯酶激活自由能为 25 kcal/mol, 来自南极低温环境的细菌脂肪酶激活自由能在 12 到 17 kcal/mol 之间^[15], Park 等人从深海沉积物构建的宏基因组文库中筛选的酯酶 EM2L8 的激活自由能为 8.34 kcal/mol^[17]。但是, 与上述各种环境来源的脂肪酶 E_a 值相比较, 来自 *S. avermitilis* 的 LpsA2 在 10℃ - 50℃ 之间具有相当低的激活自由能 (6.3 kcal/mol)。

作为碱性脂肪酶, LpsA2 的最适反应 pH 为 8.0, 在 pH 9.0 时该酶的活性仍维持在 50% 以上, 而当 pH 值稍微向酸性条件偏移至 6.5 时, 该酶的活性急剧降低, 酶活仅为 pH 8.0 时的 25%。在金属离子方面, 脂肪酶的催化活力通常受重金属离子 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 的强烈抑制, 受 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 的轻微抑制^[18]。本研究中, 1 mmol/L Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 可使酶的活性提高至 2.5 倍或以上; 而 10 mmol/L 的 Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 则强烈抑制酶活, 尤其是 Co^{2+} 使酶活完全丧失, Mg^{2+} 仍然是轻微抑制 LpsA2 的活力。10 mmol/L 的 Ca^{2+} 对酶有激活作用, 10 mmol/L EDTA 可使酶活性下降 30%, 表明它们的活性可能需要二价阳离子作为辅因子^[19]。丝氨酸类酶抑制剂, 高浓度的 PMSF (10 mmol/L) 可使 LpsA2 活性完全丧失。在有机溶剂方面, DMF、DMSO 对来自 *S. coelicolor* A3(2) 的 EstB 酶活无影响, 而对本研究的 LpsA2 有明显激活作用^[9]。总之与目前已报道的脂肪酶和酯酶相比, LpsA2 可被 1 mmol/L Co^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Zn^{2+} 强烈激活是该酶的一个显著特征^[7, 9, 14]。

高性能工业用酶的开发和利用是目前生物技术领域研究的热点之一, 脂肪酶作为一种重要的工业用酶占全球酶制剂市场的很大比例。传统发现新酶的方法是用适宜的底物筛选细胞萃取液, 其缺陷在于酶在特定的培养条件下可能并不表达, 也可能其活性被萃取液中其他组分所掩盖。随着大规模的 DNA 序列被测定, 尝试采用蛋白质异源表达和酶活检测手段从 DNA 序列中筛选有价值的酶变得很有吸引力^[10]。链霉菌由于其丰富的次级代谢, 很可能

含有性能优良的新型脂肪酶, 但这些脂肪酶可能仅在特定的生长条件下才能被表达, 使得利用传统方法进行筛选变得很困难^[9]。本研究首次对推测的来源于 *S. avermitilis* 的脂肪酶基因 *lpsA2* 进行了异源表达和酶学鉴定, 为其在食品加工、药物合成等工业生产中的应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Ruiz C, Falcocchio S, Pastor FIJ, et al. *Helicobacter pylori* EstV: Identification, cloning, and characterization of the first lipase isolated from an epsilon-proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2423-2431.
- [2] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 1999, 343 Pt 1: 177-183.
- [3] Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(1): 73-81.
- [4] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 390-397.
- [5] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* (Tokyo), 2005, 58(1): 1-26.
- [6] Gandolfi R, Marinelli F, Lazzarini A, et al. Cell-bound and extracellular carboxylesterases from *Streptomyces*: hydrolytic and synthetic activities. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 89(5): 870-875.
- [7] Zhang YH, Meng K, Wang YR, et al. A novel proteolysis-resistant lipase from keratinolytic *Streptomyces fradiae* var. k11. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(4): 346-352.
- [8] Sommer P, Bormann C, Gotz F. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(9): 3553-3560.
- [9] Soror SH, Verma V, Rao R, et al. A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): from genome sequence to enzyme activity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2007, 34(8): 525-531.
- [10] Soror SH, Rao R, Cullum J. Mining the genome sequence for novel enzyme activity: characterisation of an unusual member of the hormone-sensitive lipase family of esterases from the genome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Protein Engineering Design & Selection*, 2009, 22(6): 333-339.
- [11] Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, et al. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(5): 526-531.

- [12] Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature*, 2002, 417 (6885): 141-147.
- [13] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, et al., Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. England: The John Innes Foundation, 1985.
- [14] Falcocchio S, Ruiz C, Pastor FIJ, et al. *Propionibacterium acnes* GehA lipase, an enzyme involved in acne development, can be successfully inhibited by defined natural substances. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2006, 40(3-4): 132-137.
- [15] Georges F, Michel T, Arpigny JL, et al. Lipases from psychrotrophic Antarctic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 1990, 66: 239-244.
- [16] Choo DW, Kurihara T, Suzuki T, et al. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(2): 486-491.
- [17] Park HJ, Jeon JH, Kang SG, et al. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. *Protein Expression and Purification*, 2007, 52(2): 340-347.
- [18] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 763-781.
- [19] 杨江科, 张正平, 刘立营, 等. 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. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(8): 1095-1101.

Expression and characterization of lipase LpsA2 from *Streptomyces avermitilis*

Baojuan Wang, Ruirui Su, Jie Wang, Guoping Zhu *

(Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 24100, China)

Abstract: [**Objective**] We expressed the lipase gene *lpsA2* from *Streptomyces avermitilis* in *Escherichia coli* and characterized the enzymatic properties of LpsA2. [**Methods**] We extracted the genomic DNA of *S. avermitilis* and amplified *lpsA2* gene by PCR with specific primers. We then expressed *lpsA2* gene in *E. coli* and determined the enzymatic properties of LpsA2. We also analyzed the evolutionary relationship between LpsA2 and lipase family by using phylogenetic tree based on the alignment of amino acid sequences. [**Results**] According to the alignment of amino acid sequences, we found that LpsA2 had the active site (Ser¹³⁰-Asp²²¹-His²⁵³) which was consistent with the typical characteristics of lipases that their active centers always consisted of Ser, His and Asp, and Ser always located in the conserved five peptide structure (Gly¹²⁸-His¹²⁹-Ser¹³⁰-Gln¹³¹-Gly¹³²). We constructed the evolutionary tree and found that LpsA2 belonged to Subfamily I. 7 of lipase Family I. Furthermore, the optimal pH and temperature of LpsA2 were pH 8. 0 and 50oC, respectively. The best substrate of LpsA2 was *p*-nitrophenol myristate. The activation energy (*E_a*) of LpsA2 between 10oC and 50oC was 6. 3 kcal/mol. The enzyme activity of LpsA2 was increased to 250% or above by 1 mmol/L Co²⁺, Hg²⁺ and Zn²⁺, respectively. The activity was also elevated to 110. 7% and 138. 0% by 15% dimethylformamide and dimethyl sulfoxide, and 352. 7% and 189. 7% by 0. 1% and 1% Span-20, respectively. [**Conclusion**] The enzymatic properties of LpsA2 from *S. avermitilis* were characterized that may provide the fundament to the screening of bio-engineered bacteria and the industrial applications in food processing and drug synthesis.

Keywords: lipase; *Streptomyces avermitilis*; LpsA2; expression; phylogenetic tree

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500300, 30870062), New Century Excellent Talents in University of the Education Ministry of China (NCET-06-0558), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry and the Outstanding Youth Foundation of Science and Technology of Anhui Province (06043089) and the Key Laboratory of Biotic Environment and Ecological Safety in Anhui Province.

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-553-3883592; E-mail: gpz1996@yahoo.com

Received: 12 September 2009/Revised: 9 October 2009