

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (1) :59 – 66; 4 January 2015  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140374

## 伯克霍尔德氏菌 ZYB002 脂肪酶 *lipC24* 基因的克隆、表达及其酶学性质

林红<sup>1</sup>, 黄建忠<sup>1</sup>, 舒正玉<sup>1\*</sup>, 刘艳如<sup>1</sup>, 武海龙<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 江贤章<sup>1</sup>, 叶菲<sup>1</sup>, 郑贞芬<sup>1</sup>, 林跃鑫<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>福建师范大学, 工业微生物发酵技术国家地方联合工程研究中心, 教育部工业微生物工程中心, 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350108

<sup>2</sup>宁德师范学院生物系, 福建 宁德 352100

**摘要:**【目的】克隆伯克霍尔德菌 ZYB002 菌株中的新型脂肪酶 *lipC24* 基因, 测定其基本酶学性质, 为后续深入研究该基因在菌株中的生理功能奠定基础。【方法】根据洋葱伯克霍尔德菌 JK321 菌株的全基因组 DNA 信息, 直接设计引物从伯克霍尔德菌 ZYB002 菌株基因组中扩增出 *lipC24* 基因, 并对之进行原核表达、重组蛋白的纯化及酶学性质分析。【结果】*lipC24* 基因全长 1317 bp, 编码 438 个氨基酸残基; 多肽链中具有保守五肽-G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G-序列; 重组蛋白 LipC24 的分子量为 45 kDa; 能有效水解各种对硝基苯酯, 对中链脂肪酸的对硝基苯酯表现出偏爱性; 其催化水解反应的最适温度为 40℃, 最适 pH7.5; 40℃ 下的半衰期为 15.72 min, 在 pH 7.0 – 8.0 的条件下, 具有较好的稳定性。【结论】*lipC24* 的编码产物为一个 45 kDa 蛋白, 具有明显的脂肪酶活性, 为中温中性脂肪酶。

**关键词:**伯克霍尔德菌 ZYB002 菌株, 脂肪酶 LipC24, 克隆与表达, 酶学性质

**中图分类号:**Q936      **文章编号:**0001-6209(2015)01-0059-08

作为一种重要的非水相酶, 微生物脂肪酶 (Triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) 已被广泛应用于工业、农业、制药等诸多领域。包括源自宏基因组在内的各种脂肪酶资源被广泛挖掘<sup>[1-2]</sup>, 一些具有良好催化性能的脂肪酶, 如: 南极假丝酵母 (*Candida antarctica*) 脂肪酶 B, 洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*) 脂肪酶 A 等已开发出商业化

酶制剂。寻找和挖掘新型脂肪酶资源具有潜在的工业应用价值。

洋葱伯克霍尔德菌胞外脂肪酶 A 具有独特的活性中心结构<sup>[3]</sup>, 对映体化合物具有良好的拆分能力。洋葱伯克霍尔德菌不仅分泌胞外脂肪酶 LipA, 还具有较高的细胞结合脂肪酶活性<sup>[4]</sup>。利用洋葱伯克霍尔德菌全细胞脂肪酶催化有机合成, 已

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31370802); 福建省科技厅重点项目 (2013H0021); 福建省自然科学基金杰青项目 (2009J06013)

\* 通信作者。舒正玉, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: shuzhengyu@fjnu.edu.cn; 林跃鑫, Tel/Fax: +86-593-2967866, E-mail: lulumane@163.com

作者简介: 林红 (1989-), 女, 山东青岛人, 硕士, 主要从事微生物脂肪酶研究。E-mail: shasha20080108@126.com

收稿日期: 2014-07-28; 修回日期: 2014-09-12

有较多成功范例,如催化生物柴油的合成<sup>[5]</sup>,催化薄荷醇(酯)对映体的拆分<sup>[6]</sup>等。然而,对洋葱伯克霍尔德菌细胞结合脂肪酶的种类、细胞结合脂肪酶基因的表达调控等相关内容的研究几乎空白。

Rosenau 等(2010)报道铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)除了分泌胞外脂肪酶 LipA 外,还能产生脂肪酶 LipC<sup>[7]</sup>。LipC 不仅影响细胞的运动(Motility),还参与生物膜(Biofilm)的形成、鼠李糖脂(Rhamnolipid)的合成等生理代谢<sup>[7]</sup>。LipC 对应的编码基因(*lipC*)的转录受菌体鞭毛生物合成基因簇的共同调节<sup>[8]</sup>。分析已公布的 *B. cepacia* JK321 菌株的全基因组信息(www.burkholderia.com)发现,在该菌株的全基因组中,存在与铜绿假单胞菌脂肪酶 *lipC* 对应的脂肪酶基因(该基因座位号为:BCAM2761)。利用 PSORTb V3.0 对该基因编码的蛋白进行预测,预测结果表明:该基因编码的蛋白质定位于细胞膜(Cytoplasmic membrane),是一种细胞结合脂肪酶。到目前为止,尚未有 *B. cepacia* 菌株该脂肪酶的任何相关报道。

基于 *B. cepacia* JK321 菌株的全基因组信息,本课题组设计引物,从本实验室自主分离并保存的伯克霍尔德菌(*Burkholderia* sp.) ZYB002 菌株中,克隆到该脂肪酶基因(本课题组命名为 *lipC24*),并实现了 *lipC24* 在大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株中的功能性表达,同时初步测定了脂肪酶 LipC24 的基本酶学性质。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株与载体

*Burkholderia* sp. ZYB002 菌株由本实验室分离、鉴定并保存<sup>[9]</sup>。*E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* Origami 2 (DE3) 为本实验室保存的菌株。克隆载体 T-Vector pMD<sup>TM</sup>19 (Simple) 购自宝生物工程(大连)有限公司;表达载体 pACYC-*lipB* (*lipB* 基因 NCBI 核酸数据库登录号为:EU768869) 由本实验室先前构建并保存。

### 1.2 工具酶、引物及试剂

LA Taq 聚合酶, T<sub>4</sub>DNA 连接酶, HindIII 和 BamHI 限制性内切酶, DNA Marker 和蛋白质 Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自东盛生物科技有限公司;San Prep 柱式

质粒 DNA 小量抽提试剂盒和引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。4 条引物序列分别为: lipC24-CF ( $T_m = 69.1^\circ\text{C}$ ): 5'-CTAGTGCAGC GTCTCGGGCGCGA-3'; lipC24-CR ( $T_m = 66.3^\circ\text{C}$ ): 5'-CACCATGTCCTCCAGACGTTTCATGATGG-3'; lipC24-EF ( $T_m = 78.4^\circ\text{C}$ ): 5'-CGCGGATCCGGGCGCACCGGCCGTGTCCGA-3'; 和 lipC24-ER ( $T_m = 71.6^\circ\text{C}$ ): 5'-CCCAAGCTTTTAGTGCAGCGTCTCGGGCGC-3', 其中,下划线的碱基序列为限制性内切酶的识别位点。

氨基青霉素及氯霉素购自鼎国生物技术有限公司;脂肪酶的系列底物(4-硝基苯丁酸酯,4-硝基苯辛酸酯,4-硝基苯癸酸酯,4-硝基苯月桂酸酯,4-硝基苯肉豆蔻酸酯,4-硝基苯棕榈酸酯)购自 Sigma (美国)公司, HisTrap HP (1 mL) 和 HiTrap DEAE F. F. 购自 GE Healthcare 公司,其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 脂肪酶 *lipC24* 的克隆

以 *Burkholderia* sp. ZYB002 菌株基因组 DNA 为模板,以 lipC24-CF 和 lipC24-CR 为引物对,PCR 扩增 *lipC24* 基因的全长序列。PCR 扩增程序为:94 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$  变性 30 s,62 $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,25 个循环;72 $^\circ\text{C}$  补平 5 min。PCR 扩增产物经电泳后,回收目的片段。目的片段克隆到质粒 pMD<sup>TM</sup>19 中,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。转化子验证后,送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.4 表达载体的构建

以质粒 pMD<sup>TM</sup>19-*lipC24* 为模板,以 lipC24-EF 和 lipC24-ER 为引物对,PCR 扩增 LipC24 成熟肽编码区。PCR 扩增程序为:94 $^\circ\text{C}$  预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$  变性 30 s,66 $^\circ\text{C}$  退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,25 个循环;72 $^\circ\text{C}$  补平 7 min。PCR 扩增产物、质粒 pACYC-*lipB* 经 HindIII 和 BamHI 酶切后,用 T<sub>4</sub>DNA 连接酶连接,构建表达质粒 pBCMB-L2。连接产物转化 *E. coli* Origami 2 (DE3)。转化子验证后,送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,验证表达质粒 pBCMB-L2 阅读框。

### 1.5 *lipC24* 的诱导表达

以 0.5 mmol/L IPTG 诱导 *E. coli* Origami 2 (DE3) -pBCMB-L2 携带的外源基因 *lipC24* 的表达。20 $^\circ\text{C}$ ,220 r/min 诱导培养 20 h 后,5310  $\times$  g 离心 10

min, 收集 *E. coli* 菌体。将菌体悬浮到 pH7.4, 含 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L 氯化钠的缓冲溶液中, 超声波处理 (宁波新芝生物科技公司 JY92-II DN) 裂解菌体。具体操作如下: 50 mL 离心管装 20 mL 菌悬液, 固定于冰浴烧杯中, 设置最大功率 (900 W) 的 50%, 选择  $\Phi 6$  变幅杆, 处理 20 min。每超声 2 s, 间歇 3 s。菌体裂解液经  $10625 \times g$  离心 20 min, 收集上清液, 再用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤。收集滤液作为粗酶液, 进行下列纯化实验, 以制备电泳纯的 LipC24。

### 1.6 重组脂肪酶 LipC24 的纯化

以 0.5 mL/min 的上样速度将粗酶液样品加到 HisTrap HP 层析柱中, 先用上样缓冲溶液 (pH7.5, 含 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 20 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L 氯化钠) 洗脱 10 个柱体积, 再用洗脱液 (pH7.5, 含 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L 氯化钠) 以 1 mL/min 的流速线性梯度洗脱层析柱 60 min。以 3 mL/管分部收集洗脱液, 分别通过酶活测定和 SDS-PAGE 电泳检测洗脱液, 收集具有脂肪酶酶活的洗脱液, 合并、冻干、脱盐后, 用 pH7.5, 50 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  的缓冲溶液平衡。

HiTrap DEAE F. F. 色谱柱经 5 倍柱体积的 pH7.5, 50 mmol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液平衡后, 将前述的蛋白质样品以 0.5 mL/min 的流速上样。再用含 0 - 1 mol/L NaCl 的 pH7.5, 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液线性梯度洗脱色谱柱。洗脱液流速为 1 mL/min, 洗脱时间为 90 min。以 3 mL/试管分部收集洗脱液。通过 SDS-PAGE 和酶活定量测定收集具有脂肪酶酶活的洗脱液。洗脱液脱盐浓缩, 分析脂肪酶的酶学性质。

### 1.7 蛋白质浓度及 LipC24 相对分子量的测定

蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白<sup>[10]</sup>。脂肪酶的相对分子量及纯度采用 SDS-PAGE 检测, 分离胶浓度为 12%<sup>[11]</sup>。

### 1.8 脂肪酶酶活的测定

脂肪酶酶活的测定采用比色法进行测定<sup>[12]</sup>。在 pH7.5, 20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲溶液中, 40℃ 下, 催化 2.5 mmol/L 4-硝基苯酚酯的水解, 以每分钟释放 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需要的酶量定义为 1 个酶活单位 (U)。

## 1.9 重组脂肪酶 LipC24 的酶学性质分析

**1.9.1 最适温度和最适 pH:** 测定脂肪酶 LipC24 在 30 - 60℃ 下的脂肪酶活性, 以最高酶活为 100%, 分别计算不同温度下的相对酶活。测定脂肪酶 LipC24 在 pH4 - pH9 下的脂肪酶活性, 以最高酶活为 100%, 分别计算不同 pH 条件下的相对酶活。缓冲溶液体系分别为: pH4.0 - 5.0 (20 mmol/L 乙酸-乙酸钠), pH6.0 - 8.0 (20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 和 pH9.0 (20 mmol/L 甘氨酸-氢氧化钠)。

**1.9.2 温度稳定性和 pH 稳定性:** 在最适 pH 条件下, 将重组脂肪酶 LipC24 于 40℃ 下温育, 每隔 3 min 取样检测残余酶活。以处理时间为横坐标, 以  $\ln$  (% 残留酶活) 为纵坐标, 绘制时间-残留酶活图。据图计算出 LipC24 在 40℃ 下的半衰期  $t_{1/2}$ <sup>[13-14]</sup>。将重组脂肪酶 LipC24 分别溶于 20 mmol/L 的 pH 6.0 - 8.5 的各种缓冲溶液中, 4℃ 下保存, 24 h 后取样检测残余酶活。以不同 pH 为横坐标, 以残余酶活为纵坐标, 绘制 pH-残留酶活图。

**1.9.3 底物特异性:** 在最适 pH 和最适温度条件下, 分别测定重组脂肪酶 LipC24 对系列对硝基苯酯的水解酶活。反应体系中, 各种对硝基苯酯的浓度均为 2.5 mmol/L。

## 2 结果和分析

### 2.1 脂肪酶 LipC24 的氨基酸序列分析

*lipC24* 基因全长 1317 bp (已提交 NCBI 核酸数据库, 登录号为: KF438175), 编码 438 个氨基酸残基。将多肽链的氨基酸残基序列, 提交 NCBI 数据库进行 Blast 搜索, 查找具有一定同源性的各种蛋白质序列。Blast 搜索所列出的所有同源蛋白均为根据全基因组信息预测出的蛋白质, 且均为脂肪酶。选择同源性从 36% - 94% 的不同物种的蛋白质序列进行 BioEdit 比对分析, 分析结果如图 1。

各类同源蛋白序列之间存在 5 个高度保守的区域, 在第 3 个保守区域内, 存在脂肪酶特有的 -G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G- 的保守五肽。虽然在保守区域内, 分别在不同位置均含有保守的天冬氨酸残基和组氨酸残基 (图 1), 但由于缺乏 3D 结构信息及其功能验证, 目前, 还不能确定组成脂肪酶活性中心氨基酸残基及氧阴离子洞 (Oxyanion hole) 的氨基酸残基的具体

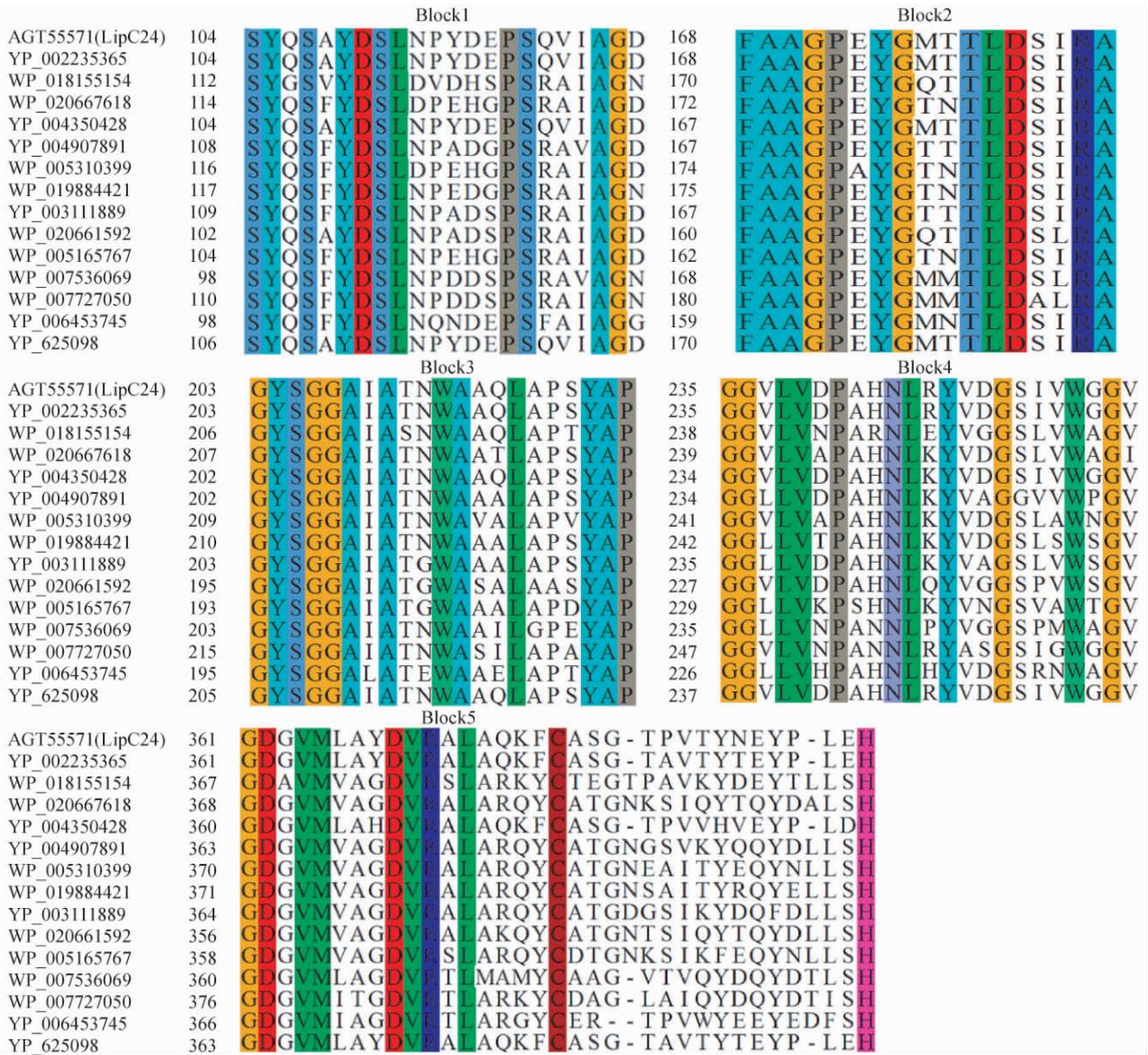


图 1. 脂肪酶 LipC24 的氨基酸序列与预测的其他物种的同源脂肪酶之间的保守氨基酸残基序列

Figure 1. Blocks of sequences conserved between LipC24 and other putative homologous lipases. AGT55571: LipC24 from *Burkholderia* sp. ZYB002; YP\_002235365: putative lipase from *B. cenocepacia* J2315; WP\_018155154: putative lipase from *D. terrigena*; WP\_020667618: putative lipase from *A. nigrescens*; YP\_004350428: putative lipase from *B. gladioli*; YP\_004907891: putative lipase from *K. setae*; WP\_005310399: putative lipase from *S. pristinaeae*; WP\_019884421: putative lipase from *S. purpureus*; YP\_003111889: putative lipase from *C. acidiphila* DSM 44928; WP\_020661592: putative lipase from *A. benzoatilytica*; WP\_005165767: putative lipase from *A. azurea*; WP\_007536069: putative lipase from *R. triatomae*; WP\_007727050: putative lipase from *R. qingshengii*; YP\_006453745: putative lipase from *M. chubuense*; YP\_625098: putative lipase from *B. cenocepacia*.

位置。

## 2.2 表达质粒 pBCMB-L2 质粒图谱及酶切验证

在 pACYC-Duet 共表达载体的 2 个多克隆位点分别插入 *lipC24* (成熟肽编码区) 和 *lipB* (NCBI 登录号为 EU768869; 去掉 LipB 蛋白跨膜疏水区编码序

列) 基因序列, 构建表达质粒 pBCMB-L2 (图 2-A)。表达质粒 pBCMB-L2 经限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切后, 产生与预期大小一致的电泳条带 (图 2-B)。测序结果也表明外源基因 *lipC24* 插入位置正确, 阅读框正确。

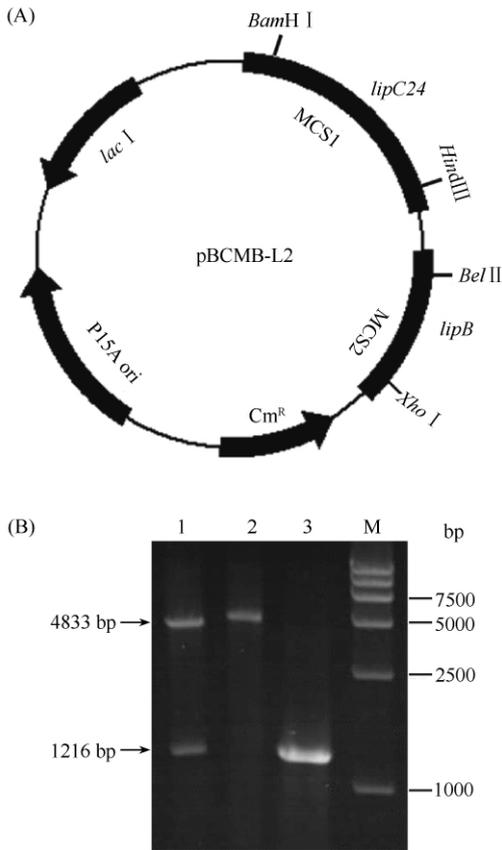


图 2. 重组表达质粒 pBCMB-L2 质粒图谱 (A) 及双酶切验证 (B)

Figure 2. Expression plasmid map of pBCMB-L2 (A) and electrophoresis after digestion by *Hind*III and *Bam*HI of pBCMB-L2 (B). M: DNA marker; lane 1: plasmid pBCMB-L2 digested by *Hind*III and *Bam*HI; lane 2: plasmid pACYC-lipB digested by *Hind*III and *Bam*HI; lane 3: PCR product of *lipC24* digested by *Hind*III and *Bam*HI.

表 1. 重组脂肪酶 LipC24 的纯化

Table 1. Purification of the recombinant LipC24 from *E. coli* Origami 2 (DE3) -pBCMB-L2

Steps	Total activity /U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Yield/%	Purification (fold)
Cell-free extract	245.39	89.78	2.73	100	1
HisTrap HP	57.96	1.8	32.20	23.62	11.79
HiTrap DEAE FF	52.74	1.09	48.31	21.49	17.70

## 2.4 重组脂肪酶 LipC24 的酶学性质分析

脂肪酶 LipC24 的最适温度为 40℃ (图 4-A), 最适 pH7.5 (图 4-C)。温度和 pH 对脂肪酶 LipC24 的活性有较大的影响。温度低于 35℃ 或高于 45℃ 后, LipC24 的活性显著下降 (图 4-A)。LipC24 的活性同时也局限于很窄的 pH 区间范围内, 一旦 pH 低于 6.0 或高于 8.0, LipC24 仅表现出极弱的催化活性 (图 4-C)。

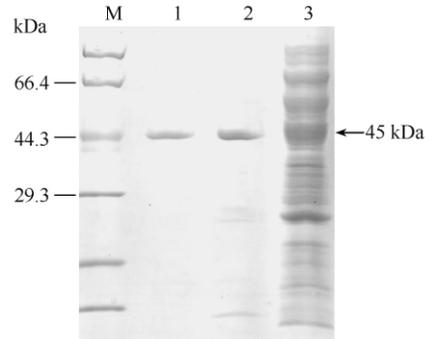


图 3. 脂肪酶 LipC24 不同纯化阶段样品的 SDS-PAGE 图谱

Figure 3. SDS-PAGE analysis of LipC24 in different purification steps. M: protein marker; lane 1: the purified LipC24 by HisTrap HP affinity chromatography column; lane 2: the purified LipC24 by HiTrap DEAE FF anion-exchange chromatography column; lane 3: cell-free extract of *E. coli* Origami 2 (DE3) -pBCMB-L2.

## 2.3 重组脂肪酶 LipC24 的纯化

脂肪酶 LipC24 的粗酶液经过 HisTrap HP 亲和层析柱和 HiTrap DEAE FF 阴离子交换色谱柱后, 即可获得电泳纯的重组脂肪酶 LipC24 (图 3), 重组脂肪酶 LipC24 的活性回收率为 21.49% (表 1)。HisTrap HP 亲和层析柱具有较好的纯化效果, 纯化倍数达 11.79。纯化后的 LipC24 水解 4-硝基苯癸酸酯 (4-Nitrophenyl decanoate) 的比活力为 48.31 U/mg (表 1)。

脂肪酶 LipC24 的温度稳定性较差, 在最适温度 40℃ 下, 半衰期  $t_{1/2}$  仅为 15.72 min (图 4-B)。在 pH7.0 - 8.0 的条件下, 具有较好的稳定性 (图 4-D)。

脂肪酶 LipC24 对中链脂肪酸的对硝基苯酯具有较好的催化活性。其最适底物为肉豆蔻酸对硝基苯酯 (C14), 而对短链脂肪酸的对硝基苯酯 (如丁酸对硝基苯酯) 表现为极弱的催化活性 (表 2)。

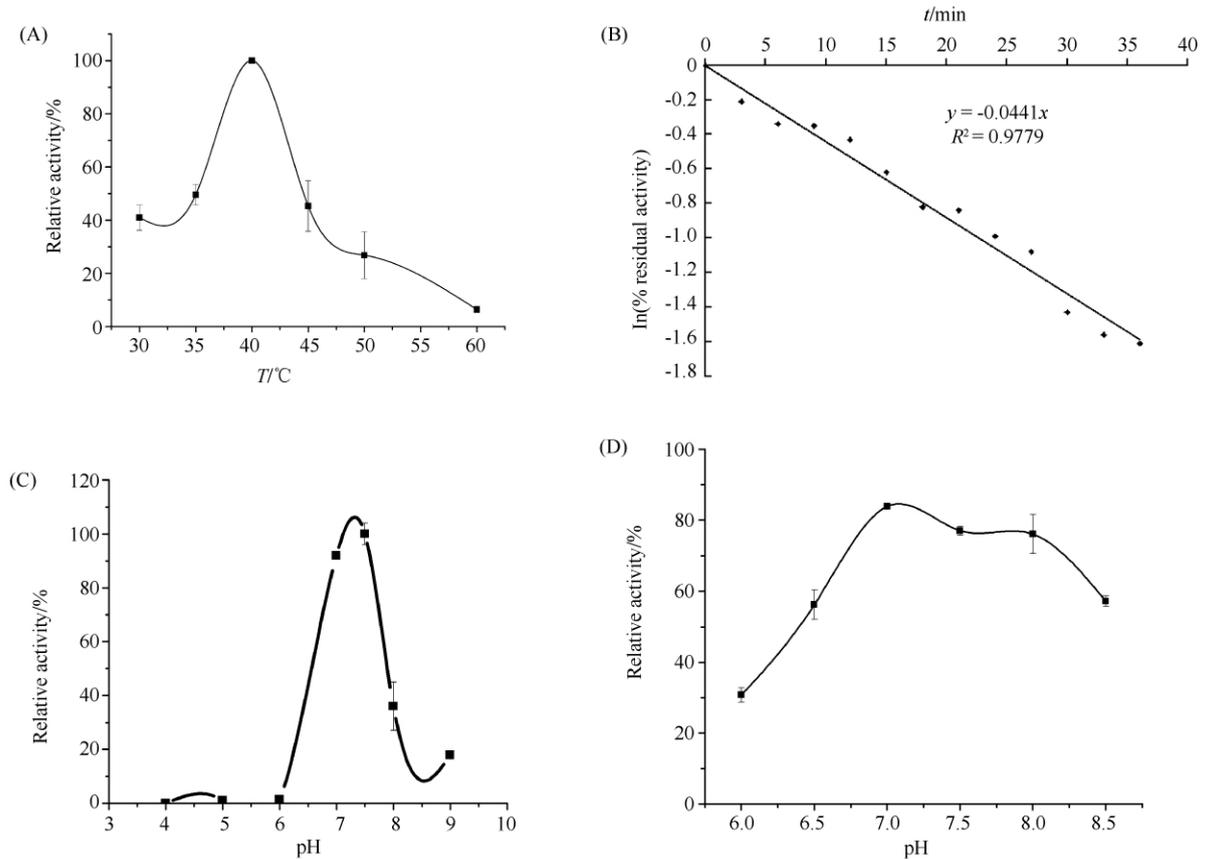


图 4. 重组脂肪酶 LipC24 的酶学性质

Figure 4. Characterization of the recombinant lipase, LipC24. A: Effect of temperature on LipC24 activity; B: Effect of temperature on LipC24 stability; C: Effect of pH on LipC24 activity; D: Effect of pH on LipC24 stability.

表 2. 重组脂肪酶 LipC24 对各类对硝基苯酯的水解活性

Table 2. The specific activity of the recombinant lipase, LipC24, towards various *p*-nitrophenyl esters

Substrate	Specific activity / (U/mg)
4-Nitrophenyl palmitate (C16)	15.63 ± 1.08
4-Nitrophenyl myristate (C14)	55.49 ± 1.87
4-Nitrophenyl laurate (C12)	31.14 ± 2.59
4-Nitrophenyl decanoate (C10)	48.31 ± 2.06
4-Nitrophenyl octanoate (C8)	18.54 ± 1.67
4-Nitrophenyl butyrate (C4)	0.51 ± 0.12

### 3 讨论

以 LipC 为代表的该族脂肪酶,其分类、酶学性质、结构特点及其生理功能,到目前为止,仅有零星的报道,且多以 *P. aeruginosa* 作为研究对象<sup>[7-8]</sup>,尚未有来自 *Burkholderia* sp. 属菌株的任何报道。Bassegoda 等(2012)从 *Rhodococcus* sp. CR-53 菌株

中克隆到一个脂肪酶(LipR)<sup>[15]</sup>,由于 LipR 的氨基酸序列及其保守区域与目前已知的八种脂肪酶均存在显著差异<sup>[16]</sup>,因此作者建议将 LipR 作为一种新型脂肪酶,并命名为“X 族”脂肪酶。模拟的 LipR 3D 结构展现出独特的 Y-型阴离子氧洞结构。*B. cenocepacia* PC184 菌株中的脂肪酶(NCBI 蛋白质数据库登录号为:YP\_625098)的氨基酸序列与 LipR 和本论文报道的 LipC24 均具有较高的相似性(图 1),因此,本文研究的脂肪酶 LipC24,也应属于“X 族”脂肪酶。

*P. aeruginosa* 的脂肪酶 LipC,影响该菌株鼠李糖脂的合成<sup>[7]</sup>。但在初步阐明的鼠李糖脂代谢网络中,脂肪酶并未直接参与鼠李糖脂的合成<sup>[17-18]</sup>。Sekhon 等(2011)报道细胞结合脂肪酶有助于鼠李糖脂从细胞表面的释放,进而提高鼠李糖脂的产量<sup>[19]</sup>。LipC24 的基本酶学性质特点(中性、中温脂肪酶)与其参与菌株代谢的主要生理功能相一致,但仍有待深入调查。

*lipC24* 基因在 *E. coli* 菌株体内的功能性表达, 依赖于另外一个脂肪酶 (LipA) 的分子伴侣 LipB (*lipA* 和 *lipB* 由同一个操纵子调控基因的表达<sup>[20]</sup>) 的共表达。缺乏 *lipB* 基因共表达情况下, 虽然可以获得 *lipC24* 基因的可溶性表达产物, 但该表达产物未能检测到脂肪酶活性。仅当 *lipC24* 基因和 *lipB* 基因共表达时, 获得的重组蛋白 LipC24 才表现出脂肪酶活性 (实验室数据)。有趣的是, LipC24 与 LipA 的氨基酸序列之间, 几乎没有任何相似性。同一个分子伴侣如何介导两个完全不同的蛋白质的折叠<sup>[21-22]</sup>, 还有待深入调查。

LipC24 作为第一个来自于 *Burkholderia* sp. 属菌株的“X 族”脂肪酶, 对其进行的初步研究, 丰富了“X 族”脂肪酶的种类; 并将为后续深入研究该脂肪酶的分泌、折叠、在菌株中的生理功能等奠定基础。

## 参考文献

- [1] Hausmann S, Jaeger KE. Lipolytic enzymes from bacteria. // Timmis KN. ed. Lipolytic enzymes from bacteria. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin: Springer, 2010.
- [2] Chow J, Krauss U, Jaeger KE, Streit WR. Carboxylesterases and lipases from metagenomes. // Bruijn FJd. ed. Handbook of Molecular Microbial Ecology II: Metagenomics in Different Habitats. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2011.
- [3] Schrag JD, Li Y, Cygler M, Lang D, Burgdorf T, Hecht HJ, Schmid R, Schomburg D, Rydel TJ, Oliver JD, Strickland LC, Dunaway CM, Larson SB, Day J, McPherson A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure*, 1997, 5 (2): 187-202.
- [4] Shu ZY, Wu JG, Cheng LX, Chen D, Jiang YM, Li X, Huang JZ. Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 166 (3): 536-548.
- [5] Liu Y, Li C, Wang SH, Chen WY. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: optimization and kinetics. *Applied Energy*, 2014, 113, 713-721.
- [6] Yu LJ, Xu Y, Wang XQ, Yu XW. Highly enantioselective hydrolysis of d l-menthyl acetate to l-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, 47 (3): 149-154.
- [7] Rosenau F, Isenhardt S, Gdynia A, Tielker D, Schmidt E, Tielen P, Schobert M, Jahn D, Wilhelm S, Jaeger KE. Lipase LipC affects motility biofilm formation and rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 309 (1): 25-34.
- [8] Martínez A, Ostrovsky P, Nunn DN. LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, is LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. *Molecular Microbiology*, 1999, 34 (2): 317-326.
- [9] Shu Z, Lin R, Jiang H, Zhang Y, Wang M, Huang J. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107 (6): 658-661.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [11] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685.
- [12] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction data. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (15): 4836-4841.
- [13] Bordes F, Tarquis L, Nicaud JM, Marty A. Isolation of a thermostable variant of Lip2 lipase from *Yarrowia lipolytica* by directed evolution and deeper insight into the denaturation mechanisms involved. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156 (2): 117-124.
- [14] Zhao HM, Arnold FH. Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1999, 12 (1): 47-53.
- [15] Bassegoda A, Pastor FI, Diaz P. *Rhodococcus* sp. strain CR-53 LipR, the first member of a new bacterial lipase family (family X) displaying an unusual Y-type oxyanion hole similar to the *Candida antarctica* lipase clan. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (6): 1724-1732.
- [16] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*, 1999, 343 (Pt1): 177-183.

- [17] Reis RS, Pereira AG, Neves BC, Freire DM. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (11) : 6377-6384.
- [18] Müller MM, Hausmann R. Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 91 (2) : 251-264.
- [19] Sekhon KK, Khanna S, Cameotra SS. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10 : 49.
- [20] Rosenau F, Tommassen J, Jaeger KE. Lipase specific foldase. *ChemBioChem*, 2004, 5 (2) : 152-161.
- [21] Pauwels K, Lustig A, Wyns L, Tommassen J, Savvides SN, Van Gelder P. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13 (4) : 374-375.
- [22] Pauwels K, Van Molle I, Tommassen J, Van Gelder P. Chaperoning anfinen: the steric foldases. *Molecular Microbiology*, 2007, 64 (4) : 917-922.

## Cloning, expression and characterization of a lipase gene, *lipC24*, from *Burkholderia* sp. ZYB002

Hong Lin<sup>1</sup>, Jianzhong Huang<sup>1</sup>, Zhengyu Shu<sup>1\*</sup>, Yanru Liu<sup>1</sup>, Hailong Wu<sup>1</sup>, Xin Li<sup>1</sup>, Xianzhang Jiang<sup>1</sup>, Fei Ye<sup>1</sup>, Zhenfen Zheng<sup>1</sup>, Yuexin Lin<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>National & Local United Engineering Research Center of Industrial Microbiology and Fermentation Technology; Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education; College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China

<sup>2</sup>Department of Biology, Ningde Normal University, Ningde 352100, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] We cloned a lipase gene, *lipC24*, from *Burkholderia* sp. ZYB002 and characterized the recombinant lipase LipC24. [Method] Based on the known genomic DNA sequence from *Burkholderia cecapia* JK321, we designed a pair of specific primers for the *lipC24* gene and then obtained the full length of *lipC24* gene. The *lipC24* gene fragment encoding the mature peptide LipC24 was then subcloned into expression plasmid, pACYC-Duet-lipB, and expressed in *E. coli*. The recombinant protein, LipC24, was purified to homogeneity by HisTrap HP chromatography column and HiTrap DEAE FF chromatography column. [Results] We expressed the *lipC24* gene from *Burkholderia* sp. ZYB002 in *E. coli* Origami 2 (DE3). Nucleotide sequencing revealed that the *lipC24* gene had an open reading frame of 1317 bp, and the deduced amino acid sequence of LipC24 corresponded to 438 amino acid residues, including a conserved -G-X<sub>1</sub>-S-X<sub>2</sub>-G-motif. The relative molecular weight of the purified LipC24 was about 45 kDa. The purified LipC24 displayed hydrolysis activity to various 4-nitrophenyl esters and substrate preference for the medium chain length 4-nitrophenyl-esters. The optimal temperature was 40°C and the optimal pH was 7.5. The lipase was stable between pH 7.0 and 8.0 for 24 hours. However, the half-life was only 16 min at 40°C. [Conclusion] The LipC24 was a 45 kDa protein, a mesotherm and neutral lipase.

**Keywords:** *Burkholderia* sp. ZYB002, lipase LipC24, cloning and expression, enzymatic characterization

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Funds of China (31370802), by the Key Project from Science and Technology Bureau of Fujian province (2013H0021) and by the Natural Science Funds for Distinguished Young Scholar of Fujian Province (2009J06013)

\* Corresponding authors. Zhengyu Shu, Tel/Fax: +86-591-22868212, E-mail: shuzhengyu@fjnu.edu.cn; Yuexin Lin, Tel/Fax: +86-593-2967866, E-mail: lulumane@163.com

Received: 28 July 2014/Revised: 12 September 2014