

# 白地霉 Y162 脂肪酶基因克隆及其在毕赤酵母中的高效表达

阎金勇, 杨江科, 徐莉, 闫云君\*

(华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074)

**摘要:** 借助生物信息学, 对已克隆的地霉属脂肪酶全长基因序列进行同源比对, 根据保守序列设计引物, 在基因组 DNA 和 cDNA 水平上, 于国内首次克隆了 *Geotrichum candidum* Y162 脂肪酶基因。G. candidum Y162 脂肪酶基因全长 1692bp, 不含内含子, 编码包括 19 个氨基酸信号肽在内的 563 个氨基酸。与 NCBI GenBank 中已报道的地霉属脂肪酶氨基酸序列有 86% 的一致性。将该基因克隆到 pPIC9K 表达载体上, 转化毕赤酵母 GS115, 摇瓶发酵 96h 后毕赤酵母分泌表达 55 U/mL 重组脂肪酶, 实现了脂肪酶的高效表达。酶学性质研究表明, 该重组脂肪酶对 C9 位顺式双键的甘油酯具有明显的底物特异性; 对甲醇、甘油等有机溶剂呈现耐受性; 最适温度和 pH 分别为 50 和 8.0, 在 pH 6.0~10.0 及 60 以下能保持 60% 以上的酶活力。底物特异性、有机溶剂、温度及 pH 耐受性赋予该重组酶良好工业应用潜力。

**关键词:** 白地霉 Y162; 脂肪酶; 基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q786, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2008)-02-0184-07

脂肪酶(EC 3.1.1.3, 甘油三酯酯水解酶)是一类水解和合成长链脂肪酸甘油酯的生物催化剂, 在油脂加工、洗涤、食品加工、医药、化妆品、皮革加工、饲料、造纸、有机合成、精细化工以及生物能源等诸多领域有着广泛的应用<sup>[1]</sup>。应用具备高度位置特异性、立体特异性、脂肪酸底物特异性的脂肪酶开发传统化学方法不能生产的产品, 在脂肪酶的工业应用中显得尤为重要。白地霉(*Geotrichum candidum*)脂肪酶因对具有 C9 位顺式(cis-9)双键的长链不饱和脂肪酸具有高度底物特异性而展现出巨大的应用价值, 该底物特异性可应用于选择性分离功能油脂(如共轭亚油酸)或外消旋异构体等<sup>[2, 3]</sup>。

近年来, 多种微生物脂肪酶基因被克隆, 其中包括重要的商业脂肪酶, 如: *Candida rugosa*、*Candida antarctica*、*Thermomyces lanuginosa*、*Rhizomucor miehei*、*Rhizopus delemar*、*Geotrichum candidum*、*Burkholderia cepacia*、*Pseudomonas pseudoalcaligenes*、*Pseudomonas mendocina* 和 *Chromobacterium*

*glumae*, 而工业大规模重组表达仅限于 *C. antarctica*、*R. miehei*、*T. lanuginosa*、*P. pseudoalcaligenes*、*P. mendocinacina* 等<sup>[4]</sup>。国内还没有关于白地霉脂肪酶基因克隆与表达方面的报道。

本文借助生物信息学, 运用 PCR 方法克隆了从土壤中自行筛选到的 *G. candidum* 脂肪酶基因, 丰富了真菌脂肪酶基因资源, 为脂肪酶的底物特异性分子机理、脂肪酶诱导表达调控机制、脂肪酶结构与功能之间的关系、酶的定向改造等分子生物学研究提供了基因资源; 该基因在毕赤酵母中实现高效表达并针对纯化酶在工业应用上的重要酶学性质如底物特异性、有机溶剂、温度、pH 耐受性等进行了研究, 为白地霉脂肪酶的大规模制备及工业应用奠定了一定的技术基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *Geotrichum candidum* Y162, 从

基金项目: 国家“863计划”(2003AA214061, 2006AA020203)

\*通讯作者。Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

作者简介: 阎金勇(1979-), 男, 湖北人, 博士研究生, 从事微生物脂肪酶研究。E-mail: yjiny@126.com

收稿日期: 2007-05-14; 修回日期: 2007-07-11

四川泸州油污土壤中筛选并鉴定; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、*Pichia pastoris* GS115 菌株和 pPIC9K 质粒由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器：***Taq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、限制性内切酶、T<sub>4</sub>DNA 连接酶和 pMD18-T 试剂盒、3'-Full RACE Core Set 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; TRIZOL 购自 Invitrogen 公司; 毕赤酵母表达用培养基及试剂按 Invitrogen 公司的 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册配制。超滤膜购自 MILLIPORE 公司, 各种甘油酯购于 Sigma 公司。PCR 仪 53333 (Eppendorf AG 22331 Hamburg), 电泳仪 DYY-5(北京市六一仪器厂), 凝胶成像系统 EL Logic200(Kodak 公司, USA)。

**1.1.3 引物：**根据已报道的 *Geotrichum* 属脂肪酶基因的保守核苷酸序列设计简并引物 F1 和 R1, 扩增全长脂肪酶基因; 根据 GCLY162 基因序列设计引物 F2 和 R2 (下划线序列为限制性内切酶 *EcoR* 和 *Not* 识别序列) 扩增不含信号肽序列的成熟 GCL 基因。引物均由上海生工合成(表 1)。

**1.2 脂肪酶水解活力和蛋白质浓度的测定**

橄榄油乳化滴定法<sup>[5]</sup>：在 50℃, 0.05mol/L, pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 2mmol/L CaCl<sub>2</sub> 的条件下, 将每毫

升脂肪酶酶液水解橄榄油每分钟产生 1 $\mu$ mol 游离脂肪酸所需的酶量定义为一个脂肪酶活力单位(U/mL)。蛋白质浓度的测定采用 Bradford 法<sup>[6]</sup>进行, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

**表 1 扩增全长脂肪酶基因和成熟脂肪酶基因的引物**  
**Table 1 Primers used for amplification of complete and mature lipase gene**

Primer	Sequence (5'→3')	Size/bp
F1	ATGGTWTCCAAAAVCTTKTTYTTRGC*	26
R1	TTAACCGTAGAGATTAACGTCAGWCTC*	27
F2	CTGAATTC <u>CAAGCTCCTACGGCTGTTCT</u> **	28
R2	CTTGCGGCCGCTTAACCGTAGAGATTAACGT**	31

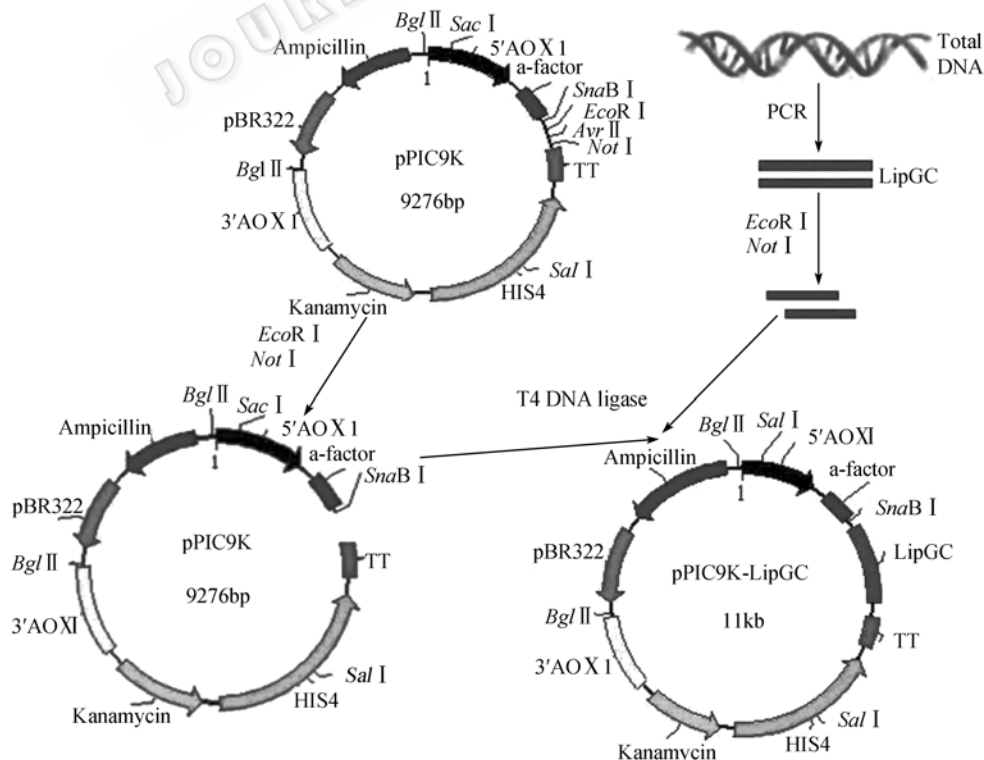
\*: W-A, T; V-G, A, C; K-G, T; Y-C, T; R-A, G. \*\*: underlined sequences correspond to introduced restriction sites *EcoR* and *Not* .

**1.3 核酸的提取和 cDNA 模板的合成**

基因组 DNA 的提取参照文献<sup>[7]</sup>进行, RNA 提取按 TRIZol 试剂说明书进行。第一链 cDNA 合成(反转录反应)按 3'-Full RACE Core Set 试剂盒说明书进行。

**1.4 脂肪酶基因 GCL 的克隆和重组质粒 pPIC9K-GCL 的构建**

以 F1 和 R1 为引物, 分别以 *G. candidum* Y162 基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 扩增白地霉全长脂肪



**图 1 重组质粒 pPIC9K-GCL 的构建**

Fig.1 Strategy for the insertion of lipase gene of *G. candidum* into vector pPIC9K.

酶基因(GCL)。反应条件: 94°C 5min; 94°C 1min, 52°C 1min, 72°C 1min, 28 个循环; 72°C 10min。PCR 扩增产物与 pMD18-T 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。阳性转化子验证后由上海英骏生物技术有限公司测序。

以 F2 和 R2 为引物, 以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增不含信号肽序列的成熟 GCL 基因。用 *Eco*R 和 *Not*I 限制性内切酶酶切 PCR 产物和 pPIC9K 质粒, 纯化后用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 重组质粒 pPIC9K-GCL 的构建如图 1。将产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布 LB-Amp 平板, 37°C 培养 12~16h, 挑取单菌落用 F2 和 R2 引物进行菌落 PCR 验证, 将 PCR 验证为阳性的菌落分离纯化后送上海英骏生物技术有限公司测序, 以验证重组质粒中 GCL 基因是否正确插入 $\alpha$ 信号肽序列之后。

### 1.5 重组质粒的筛选和转化

将重组质粒 pPIC9K-GCL 和 pPIC9K 质粒用 *Sac*I 单酶切线性化后, 分别转化 *P. pastoris* GS115。重组转化子的筛选鉴定及诱导表达参照 Invitrogen 公司的 Multi-Copy Pichia Expression Kit 操作手册进行。转化子的验证及多拷贝筛选: 取 25 $\mu$ L 菌液涂布选择性培养基 MD 平板, 于 30°C 培养 2~4d。挑取 MD 平板上的转化子用 F2 和 R2 引物进行菌落 PCR 验证; 阳性转化子用 YEPD-G418 平板进行多拷贝筛选, 用 YEPD-罗丹明 B 平板进行功能验证。选择最佳转化子进行诱导表达。

### 1.6 诱导表达

接种最佳转化子单菌落于 BMGY 培养基中, 培养至  $OD_{600}=2\sim 6$ (16~18h)后移接到 BMMY 培养基中进行诱导表达。每隔 24h 加 0.5%(终浓度)甲醇诱导。分别在 0、24h、48h、72h、96h、120h、144h 取样测定脂肪酶活力, 确定最佳诱导时间。

### 1.7 脂肪酶的分离纯化

取发酵 96h 的重组 *P. pastoris* 发酵液, 8000r/min 离心 10min 收集上清液。300mL 上清液经截留分子量为 50kDa 超滤膜过滤后溶解于 100mL 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中, 将上述酶液加到已用 0.02 mol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲溶液预平衡的 DEAE-Sepharose Fast Flow (2.0cm  $\times$  20cm) 阴离子交换柱上, 用 0~1 mol/L 的 NaCl 线性梯度洗脱, 收集有酶活性的部分。

### 1.8 酶学性质

**1.8.1 温度对酶的影响:** 在 pH 8.0, 0.05mol/L 的

Tris-HCl 中, 在不同温度下测定上述纯酶活力, 寻求最适温度。以酶活最高者设为 100%。在 pH 8.0, 0.05mol/L 的 Tris-HCl 中, 在不同温度下保温 12h, 测定残余酶活力, 确定温度稳定性。处理前的酶活力设为 100%。

**1.8.2 pH 对酶的影响:** 在 0.05mol/L 不同 pH 的缓冲液 (柠檬酸钠-柠檬酸 (pH 4-8); Tris-HCl (pH 7-9); glycine-NaOH (pH 9-10); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>- NaOH (pH 11)) 中, 50 $\mu$ L 下测定酶活力, 寻求最适 pH。以酶活最高者设为 100%。在 0.05mol/L 不同 pH 的缓冲液中, 室温处理 12h, 测定残余酶活力, 确定 pH 稳定性。处理前的酶活力设为 100%。

**1.8.3 有机溶剂对酶的影响:** 将酶液与有机溶剂等体积混合, 室温处理 12h, 测残余酶活力, 处理前处理前的酶活力设为 100%。

**1.8.4 底物特异性:** 以辛酸甘油酯 (C8:0, 短链饱和脂肪酸甘油酯代表底物)、硬脂酸甘油酯 (C18:0, 长链饱和脂肪酸甘油酯代表底物)、油酸甘油酯 (C18:1, cis-9, C9 位顺式双键的长链不饱和脂肪酸甘油酯代表底物)、反式油酸甘油酯 (C18:1, trans-9, C9 位反式双键的长链不饱和脂肪酸甘油酯代表底物)、亚油酸甘油酯 (C18:2, cis-9, 12)、亚麻酸甘油酯 (C18:3, cis-9, 12, 15) 为底物, 按 1.2 方法测定酶活力, 以油酸甘油酯的酶活力为 100%。

## 2 结果

### 2.1 脂肪酶基因的克隆与序列分析

搜索 NCBI GenBank 数据库, 已克隆的 *Geotrichum* 属全长脂肪酶基因 (包含信号肽) 有 *Galactomyces geotrichum* 脂肪酶 cDNA (登录号 E02678)、*G. geotrichum* 胞外脂肪酶 mRNA (登录号 X78032)、*Geotrichum fermentans* 脂肪酶 I 前体的 mRNA 全序列 (登录号 AB000260) 以及 *G. geotrichum* 脂肪酶基因全序列 (登录号 DQ313172)。以上述脂肪酶基因开放式阅读框 (ORF) 5' 端 (含起始密码子) 和 3' 端 (含终止密码子) 保守区核苷酸序列为基础, 利用 BioEdit 生物学软件设计正反向引物 F1 和 R1。

以基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 都扩增出约 1700bp 大小的目的片段 (用 mRNA 为模板直接进行 PCR 反应, 没有扩增出目的片断)。DNA 和 cDNA 来源的扩增产物测序结果比较表明: 所克隆的 GCL 基因 ORF1692bp, 不含内含子, 编码 563 个氨基酸; 其中信号肽有 57bp, 编码 19 个氨基酸 (图 2 中箭头标记信号肽切除位置), 与

Bertolinimc 等的报道一致<sup>[8]</sup>。该基因序列已登录至 GenBank(登录号为 DQ841279)。与已报道的基因的氨基酸序列进行多重比对发现, GCL 与 AB000260、

DQ313172、X78032、E02678 分别有 86%、85%、81%、81%的一致性。GCL 基因含有脂肪酶活性中心 -G-E-S-A-G-区的保守五肽序列(图 2 中方框标记)、催

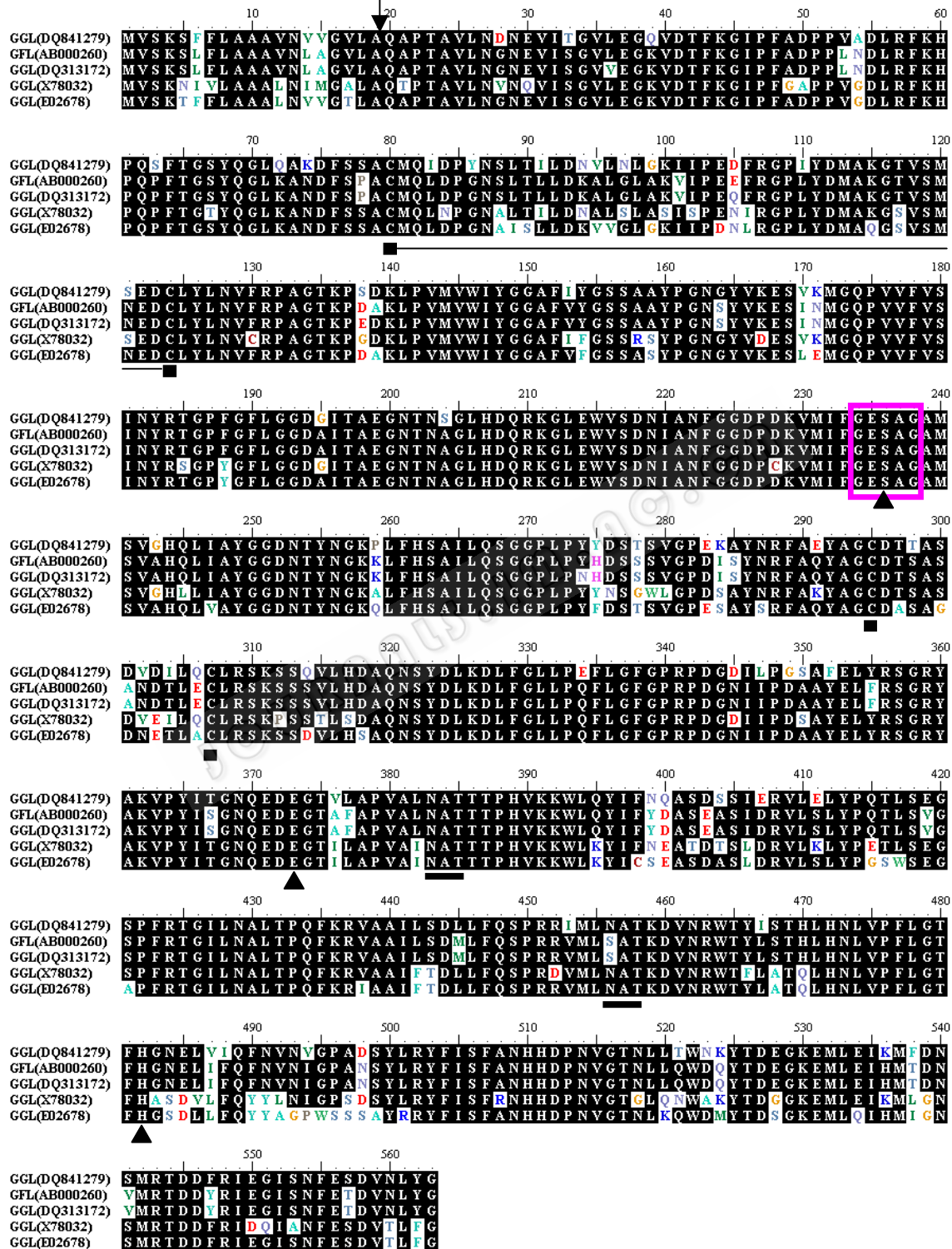


图 2 GCL 与 AB000260、DQ313172、X78032、E02678 的多重比对

Fig. 2 Multi alignment of amine acid sequence of *G. candidum*Y162 lipase and the related sequence. The catalytic triad -Ser<sup>236</sup>-Glu<sup>373</sup>-His<sup>482</sup>- is marked by triangles. The conservative motif -Gly<sup>234</sup>-Glu-Ser-Ala-Gly<sup>238</sup>- is boxed. Line indicate flap domain and bold lines indicate the potential glycosylation sites. Rectangles and arrowhead show the disulfide bonds and signal peptide proteolytic cleavage, respectively.

化活性中心三联体 Ser<sup>236</sup>-Glu<sup>373</sup>-His<sup>482</sup>(图 2 中三角形标记)及两处潜在的糖基化序列-N-A-T-(图 2 中粗线标记)。-Cys<sup>80</sup>~Cys<sup>124</sup>-和-Cys<sup>295</sup>~Cys<sup>307</sup>-为二硫键形成位置(图 2 中矩形标记); Met<sup>81</sup>~Asp<sup>123</sup> 序列形成白地霉脂肪酶家族的“盖子”结构(图 2 中细线标记), 参与脂肪酶的“界面激活”<sup>[8, 9]</sup>。

## 2.2 脂肪酶的诱导表达

MD 平板筛选出的转化子, 经过 G418 复筛, 获得抗性较强的 1~5 转化子, 在 YEPD-罗丹明 B 上点样, 菌落周围可见明显的水解圈(图 3)。选取最佳转化子进行诱导表达。

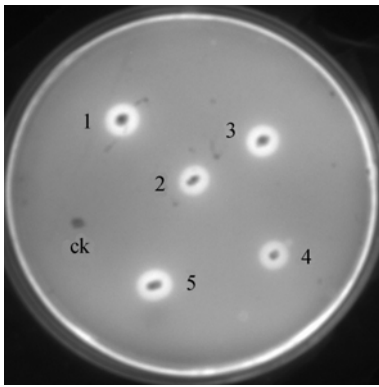


图 3 YEPD-罗丹明 B 平板转化子在紫外光下的水解圈  
Fig. 3 The clear zones produced by transformants on YEPD-Rhodamine B agar plates exposed by UV light. CK: Transformant containing vector pPIC9K as control; 1~5: Transformants containing recombinant plasmid pPIC9K-GCL.

表 3 重组脂肪酶的纯化

Table 3 Purification of GCL from culture supernatant of *P. pastoris*

Purification procedure	Total activity /U	Total protein/mg	Specific activity/(U/mg)	Yield/%	Purification fold
Crude lipase	16500	90	183.33	100	1
Ultrafiltration	15865	64	247.89	96	1.35
DEAE-Sepharose chromatograph	7025	11	638.64	42.58	3.48

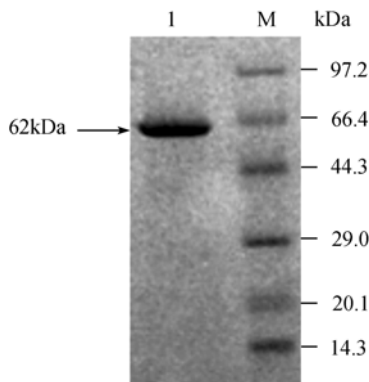


图 4 纯化的重组 GCL 脂肪酶 SDS-PAGE 分析  
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant lipase GCL. M. Protein marker, 1. Purified recombinant lipase GCL.

表 2 为不同发酵时间 GCL 重组脂肪酶表达量, 96 h 为最佳诱导表达时间, 表达量最高为 55 U/mL。与初始野生菌 9.6 U/mL 相比, 酶活力提高了 5.73 倍; 120~140 h 的产酶量有所下降。Holmquist 等<sup>[10]</sup>报道, 在无蛋白酶抑制剂的情况

表 2 重组脂肪酶的诱导表达

Table 2 Recombinant lipase secreted induced by methanol for 0~144h

Fermentation time/h	0	24	48	72	96	120	144
Enzyme activity / (U/mL)	0.9	28	42	49	55	35	23

下, 发酵后期有少量毕赤酵母细胞裂解释放胞内蛋白酶, 降解部分脂肪酶; 为谨慎起见, 应在发酵培养基中加入蛋白酶抑制剂 PMSF, PMSF 对酶活力无影响。

## 2.3 重组脂肪酶的分离纯化

发酵上清液经截留分子量为 50kDa 的膜超滤、DEAE-Sepharose 离子交换层析纯化后得到活性回收率为 42.58%, 纯化倍数为 3.48 倍的纯酶(表 3), SDS-PAGE 电泳显示单一的 62kDa 左右重组脂肪酶蛋白条带(图 4), 与已报道的天然或重组白地霉脂肪酶分子量大小接近, 不同程度的糖基化修饰可能会引起脂肪酶分子量在 55kDa~66kDa 范围内变化<sup>[11, 12]</sup>。

本研究经两步纯化得到的纯化倍数和活性回收

率都较低。Holmquist 等<sup>[10]</sup>报道重组毕赤酵母分泌的杂蛋白较少, 对于一般性的研究及应用, 可以直接将发酵液进行离心除细胞, 脱盐、浓缩等处理而获得较纯的重组脂肪酶, 避免分离纯化的繁琐及造成的酶活力损失。

## 2.4 酶学性质

该脂肪酶最适温度 50℃, 在 60℃以下能保持 68% 以上的酶活力; 最适 pH8.0, 在 pH6~10 范围内能保持 62% 以上酶活力。在甲醇、甘油、正己烷、环己烷、正庚烷、异辛烷、苯、乙醚等有机溶剂中处理 12h 仍能保留 80% 以上的酶活力。与短链饱和甘油酯(C8:0)、长链饱和甘油酯(C18:0)和反式双键甘油酯(C18:1,

trans-9)相比,该脂肪酶对含有 cis-9 双键的甘油酯(C18:1, cis-9; C18:2, cis-9, 12; C18:3, cis-9, 12, 15)的酶活力高出 3~4 倍。

### 3 讨论

常规真菌基因克隆的策略包括:①分离纯化所克隆基因编码的蛋白质,对其蛋白质两端的氨基酸进行测序,反推设计核苷酸简并引物,通过 RT-PCR 扩增全长 cDNA;②以异源基因为探针,从基因组文库中通过杂交获得阳性克隆,经测序后获得基因两端的序列,设计引物,经 RT-PCR 扩增全长 cDNA;③采用功能平板-cDNA 文库的方法,转化子在底物平板上可分解底物从而在菌落周围产生透明圈或颜色变化而挑选出阳性克隆。④通过 RT-PCR 扩增出保守的片段,通过 5'或 3'-RACE 的方法扩增全长基因。常规方法工作量大,成功率低。已报道的 *G. candidum* 和 *Galactomyces geotrichum* 脂肪酶基因序列不含内含子<sup>[8, 13]</sup>,为严谨起见,作者采用 RT-PCR 扩增出 *G. candidum*Y162 全长 cDNA 序列,与其 DNA 序列比较分析,证实该脂肪酶基因不含内含子。对 *Geotrichum* 属基因序列进行同源比对,根据保守序列设计引物,直接在基因组 DNA 水平上成功扩增并表达了 *G. candidum*Y162 脂肪酶基因。因此,对于克隆与表达这类不含内含子的真菌基因,可以直接在基因组 DNA 水平上操作,避开 RNA 操作。

采用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)表达重组蛋白有一些成功的例子,但由于常发生质粒丢失和重组蛋白超糖基化现象,活性蛋白的表达量普遍偏低。Bertolini、Vernet 等报道 *G. candidum* 脂肪酶基因在酿酒酵母中的表达量较低(5U/mL)<sup>[14, 15]</sup>。

*P. pastoris* 表达系统调控机理严格,分泌效率高,质粒能在基因组的特定位点稳定整合,重组转化筛选简单,易于进行高密度发酵,外源蛋白表达量高。Catoni、Holmquist 等在毕赤酵母中实现了 *G. candidum* 脂肪酶大量表达<sup>[10, 11]</sup>。Catoni 等构建的重组毕赤酵母在 1L 反应器发酵水平上,白地霉脂肪酶表达量为 23~50 U/mL<sup>[11]</sup>。本研究重组毕赤酵母分泌表达出活性脂肪酶,在摇瓶发酵水平上的表达量为 55 U/mL,比野生菌产酶量提高 5.73 倍;也高出 Catoni 等的报道<sup>[11]</sup>,表明毕赤酵母是一种有效的 *G. candidum* 脂肪酶表达系统。有必要对重组毕赤酵母发酵条件进行优化,以降低培养基成本并在反应器中

进行高密度发酵,提高产酶量,进而实现大规模发酵生产白地霉脂肪酶。

Bertolini 等利用构建一系列突变酶,对白地霉脂肪酶底物特异性分子机理进行了研究,指出位于 368~425 的 58 个氨基酸决定白地霉脂肪酶的底物特异性<sup>[14]</sup>,但更确切的分子机理有待深入研究,本文构建的毕赤酵母高效表达体系为突变酶的表达提供了很好的平台。

Holmquist 和 Catoni 等报道的白地霉脂肪酶最适 pH 为 7.0~7.5,最适温度为 25~40℃,高于 37℃酶就急剧失活<sup>[10, 11]</sup>。耐高温和具备宽广的 pH 耐受性使 *G. candidum*Y162 脂肪酶适合工业催化。*G. candidum*Y162 脂肪酶偏爱 cis-9 双键的甘油酯底物,与 Bertolini 等的报道类似。而 Sugihara 则报道白地霉脂肪酶具有宽广的底物水解谱,没有明显的 cis-9 底物特异性<sup>[16]</sup>。可能原因是白地霉脂肪酶存在同工酶形式,而这些同工酶的底物特异性有差异。由于天然油脂中大多含有 cis-9 双键的甘油酯,利用 *G. candidum*Y162 脂肪酶底物特异性,选择性水解或酯化获得高营养价值的多不饱和脂肪酸(FUFAs),在功能食品开发中尤为重要。*G. candidum*Y162 脂肪酶具备优良的有机溶剂耐受性,初步表明该酶是有机合成与转化的潜在催化剂。生物柴油制备体系中的甲醇和甘油常使脂肪酶失活,成为脂肪酶法生产生物柴油瓶颈之一<sup>[17]</sup>。*G. candidum*Y162 脂肪酶对甲醇和甘油的耐受性,推测该脂肪酶很可能适合催化生物柴油。

### 参 考 文 献

- [1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 9: 235-251
- [2] 石红旗,姜伟,张爱军,等.白地霉脂肪酶选择性酯化分离 CLA 异构体的研究. *中国食品学报(Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology)*, 2005, 5 (1): 24-30
- [3] Zarevucka M, Kejik Z, Samana D, et al. Enantioselective properties of induced lipases from *Geotrichum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37: 481-486
- [4] Schmidt DC. Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1999, 7: 2123-2130
- [5] Burkner JF, Maugeri F, Rodrigues MI. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*, 2004, 91: 77-84
- [6] 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
- [7] 程度,黄翔宇,李宝健.药用真菌高质量总 DNA 的制备及基因组文库的构建. *菌物系统(Mycosystema)*, 2002, 21 (1):

- 137–139
- [8] Bertolinimc MC, Laramée L, Thomas DY, *et al.* Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Eur J Biochem*, 1994, 219: 119–125
- [9] Fernández L, Victoria IP, Zafra A, *et al.* High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif*, 2006, 49: 256–264
- [10] Holmquist M, Tessier DC, Cygler M. High-Level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif*, 1997, 11: 35–40
- [11] Catoni E, Schmidt DC, Brocca S, *et al.* Overexpression of lipase A and B of *Geotrichum candidum* in *Pichia pastoris*: High-level production and some properties of functional expressed lipase B. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11(9): 689–695
- [12] Jacobsen T, Poulsen OM. Separation and characterization of 61- and 57-kDa lipases from *Geotrichum candidum* ATCC- 66592. *Can J Microbiol*, 1992, 38: 75–80
- [13] Phillips A, Pretorius GH, Rensburg HG. Molecular characterization of a *Galactomyces geotrichum* lipase, another member of the cholinesterase/lipase family. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1252: 305–311
- [14] Bertolini MC, Schrag JD, Cygler M, *et al.* Expression and characterization of *Geotrichum candidum* lipase I gene, comparison of specificity profile with lipase II. *Eur J Biochem*, 1995, 228: 863–869
- [15] Vernet T, Ziomek E, Recktenwald A, *et al.* Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1993, 268 (35): 26212–26219
- [16] Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y. Separation and characterization of two molecular forms of *Geotrichum candidum* lipase. *J Biochem*, 1990, 107: 426–430
- [17] Yang Jk, Guo DY, Yan YJ. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. *J Mol Catal B: Enzym*, 2007, 45: 91–96

## Cloning and overexpression of lipase gene from *Geotrichum candidum* Y162

Jinyong Yan, Jiangke Yang, Li Xu, Yunjun Yan\*

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** By means of bioinformatics, we aligned nucleotide sequence of reported lipase gene from *Geotrichum*. Primers were designed based on the conservative nucleotide sequence, and the lipase gene of *G. candidum* Y162 was cloned for the first time in China. Nucleotide sequencing revealed that the open reading frame has 1692 nucleotides without any introns, encoding 563 amino acid residues including a signal sequence of 19 amino acid residues, which is 86% identical to lipase I of *G. fermentans*. Subsequently, we cloned the lipase gene into expression vector pPIC9K, and then transformed into *Pichia pastoris* GS115. Cultures of recombined *P. pastoris* accumulated active enzyme in the supernatant to levels of 55 U/mL after induction for 96 hours in shake flasks. The purified lipase exhibited maximum activity at 50°C and pH 8.0, and was stable between pH 6.0 and 10.0 and below 60°C. Lipase activity was compatible with the presence of organic solvents such as methanol, *n*-heptane, hexane, cyclohexane, glycerol, benzene and diethyl ether. Lipase showed hydrolysis preference for triacylglycerol substrates containing *cis*-9 unsaturated fatty acid. The results suggest that the lipase could be a candidate for industrial applications.

**Keywords:** *Geotrichum candidum* Y162; lipase; gene; cloning; expression