

Bohaisea-9145 海洋耶氏酵母碱性脂肪酶基因的克隆、异源表达和重组酶学性质*

李忠磊^{1,2} 王跃军¹ 盛军¹ 刘均忠¹ 孙谧¹

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 上海海洋大学食品学院 上海 201306)

摘要 采用基因重组和分子生物学相关技术,对 *Yarrowia lipolytica* Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶(*Y. lipolytica* Bohaisea-9145, LipYp)基因 lipYp (1116bp)克隆并在 *Pichia pastoris* 中进行了异源真核表达研究。通过 MD 和 MM 平板及 PCR 扩增,筛选和鉴定了重组子。结果表明,阳性重组子经摇瓶发酵 54h 后上清液酶活力达到 1956U/ml。发酵液经两步纯化得到在 SDS-PAGE 上显示为单一条带的重组脂肪酶。实验同时研究了不同反应温度、pH 值对重组 LipYp 活力和稳定性的影响,结果显示重组 LipYp 最适反应温度和 pH 分别为 35℃和 8.5,在 pH 7.0—10.5 之间以及 45℃以下有较好稳定性。另外,重组脂肪酶对中长链对硝基苯基酯类和甘油三酯类(C10—C12)有较强的水解能力。

关键词 *Y. lipolytica* Bohaisea-9145, 毕赤酵母 GS115, 基因克隆, 异源表达, 性质

中图分类号 Q815

耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)所产脂肪酶种类繁多,包括胞外、胞壁及胞内多种脂肪酶,其所产的脂肪酶几乎能催化所有链长底物的酯化反应,在有机相中还可以催化转酯反应,并用于分离外消旋混合物(Fickers *et al*, 2011)。*Y. lipolytica* 与 *C. rugosa*、*C. deformans*、*G. candidum* 等酵母一样,已经成为目前研究最广泛的非常规性酵母(Joseph *et al*, 2008)。虽然前期已有许多关于陆生环境下筛选出的耶氏酵母脂肪酶的报道(Yu *et al*, 2007; Song *et al*, 2006; Nicaud *et al*, 2002),但自海洋中筛选的产脂肪酶的 *Yarrowia lipolytica* 却鲜有报道(Sathish Yadav *et al*, 2011; Joseph *et al*, 2008; Kim *et al*, 2007),特别是有关海洋产脂肪酶菌株的克隆及高效表达更成为了研究热点(张金伟等, 2006; 徐同成等, 2009)。邵铁娟等(2004)从渤海海域的 2000 多份海水、海泥样品中分离筛选到 *Yarrowia lipolytica* BohaiSea-9145, 研究发现该酵母

所产的胞外脂肪酶具有低温催化活力高、在碱性条件下性质稳定、与金属离子及表面活性剂配伍性好等一系列优点(邵铁娟等, 2004; 董宏伟等, 2004)。然而因该酵母产酶复杂、脂肪酶产量低,分离纯化困难等诸多因素制约了野生型菌株的进一步研究。巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统既具备原核生物生长快速、培养基廉价和实验手段简单可行的特点,又具备典型的真核生物分子生物学特性(于平, 2005)。随着菌株和载体的改良以及操作技术上的显著进步,此系统已成为实验室研究及商业生产重组蛋白的重要工具之一(Daly *et al*, 2005)。

因此,本实验以前期获得的产海洋低温碱性脂肪酶的耶氏酵母为基础,以提高脂肪酶产量、简化生产工艺为目的,采用相关的基因工程和分子生物学手段克隆得到了编码该脂肪酶的基因并在毕赤酵母表达系统中实现了异源表达,同时对重组脂肪酶的

* 国际科技合作与交流专项, 2011DFB30250 号; 国家“863”计划资助项目, 2011AA090703 号; 中央级公益性科研院所基
本科研业务费专项项目, 20603022011011 号。李忠磊, E-mail: wenchengwin@163.com

通讯作者: 孙 谧, 研究员, 博士生导师, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-10-15, 收修改稿日期: 2011-12-29

酶学特性和酶动力学特性展开了深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料

Escherichia coli DH5 α 和 *Y. lipolytica* Bohaisea-9145(邵铁娟等, 2004)由本实验保存。 *P. pastoris* GS115、 plasmid pPIC9k 均购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶和 T₄ DNA 连接酶购自 TakaRa(大连)有限公司; 质粒小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany)公司; Protein Marker、DNA Marker 购自 Fermentas 公司(Fermentas, Shanghai, China); 酵母提取物, 蛋白胨, 无氨基酸酵母氮源(YNB)购自 Sangon (Sangon, Shanghai, China)公司; 对硝基苯酚酯类和脂肪酸甘油三酯类底物购自 Sigma 公司。其它化学试剂均购自国药集团。

1.2 lipYp 在毕赤酵母中的克隆和表达

1.2.1 目的基因的提取和表达载体的构建 根据 LipYp 的核酸序列(GenBank accession HM194605), 设计出 lipYp 基因上游引物 F1: 5'-GACGAATTCGC-AGGCGTGTCTCAAGG-3'和下游引物 R1: 5'-AAC-GCGGCCGCGTTCTCAACTTGTGGGG-3'), 并引入 *EcoR* 和 *Not* 限制性内切酶位点(用下划线标注), 以 *Y. lipolytica* Bohaisea-9145 基因组为模板, 进行 PCR 扩增。采用产物纯化试剂盒进行纯化。

用 *EcoR* /*Not* 双酶切 PCR 产物和 pPIC9K, 1% (质量分数, 下同)的琼脂糖凝胶电泳分别回收相应的条带, 用 T₄连接酶 16℃过夜连接, 将两者连接后, 转化进入大肠杆菌 DH5 α 。构建好的载体命名为 pPIC9K-lipYp。各操作步骤参照工具酶的说明书完成(Sambrook

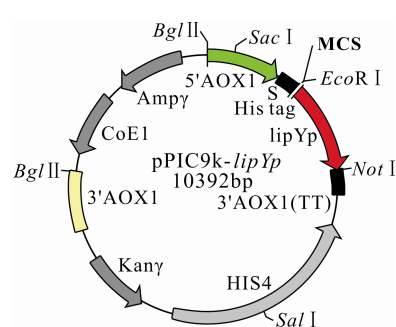


图 1 重组质粒 pPIC9K-lipYp

Fig.1 The recombinant plasmid pPIC9K-lipYp

et al, 1989; www.invitrogen.com¹⁾). 构建的表达载体见图 1。

1.2.2 重组质粒 pPIC9k-lipYp 的转化和酶切 CaCl₂法(Sambrook *et al*, 1989)将重组质粒转化入大肠杆菌 DH5 α , 涂布于含有氨苄青霉素(100

$\mu\text{g/ml}$)的 LB 平板(10g/L NaCl, 10g/L 胰蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 20g/L 琼脂), 37℃培养 16h, 筛选阳性克隆。挑取阳性克隆进行摇瓶培养, 富集并提取质粒。 *EcoR* /*Not* 双酶切, 1%琼脂糖凝胶电泳, 采用 PCR 扩增和酶切法对重组质粒进行鉴定。

1.2.3 毕赤酵母转化和重组子的筛选 重组质粒 pPIC9k-lipYp 经过 *Bgl* 线性化后, 产物采用电转化法(电转化条件: C=25 μF , PC=400 , V=1.5kV, 脉冲时间=10ms)转化入毕赤酵母 GS115。电转化仪 Gene Pulser 购自 Bio-Rad 公司。利用含有氨苄青霉素(100 $\mu\text{g/ml}$) MD 平板(13.4g/LYNB, 0.4mg/L 生物素, 20g/L 葡萄糖, 20g/L 琼脂)筛选阳性克隆。

阳性重组子表型的鉴定(Mut⁺或 Mut^s)使用 MD 和 MM (13.4g/LYNB, 0.4mg/L 生物素, 20g/L 甲醇, 20g/L 琼脂)平板。挑取单菌落, 分别点到 MD 和 MM 平板上, 以鉴定重组转化子的表型。挑取 Mut⁺型重组子于 YPD 培养基中进行培养, 提取基因组, 并以其为模板进行 PCR 扩增鉴定。

1.2.4 重组毕赤酵母的诱导表达 将阳性重组子接种于 1L 振荡摇瓶, 内含 200ml BMGY 培养基(10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 13.4g/L YNB, 0.4mg/L 生物素, 10g/L 甘油, pH 6.0 的 100mmol/L 磷酸盐缓冲液), 30℃, 200r/min 培养。约 22—24h 菌体密度 OD₆₀₀ 达到 12 左右, 离心收集菌体, 将菌体转移到含 200ml BMMY 培养基(10g/L 酵母提取物, 20g/L 蛋白胨, 13.4g/L YNB, 0.4mg/L 生物素, 5g/L 甲醇, pH 6.0 的 100mmol/L 磷酸盐缓冲液)的另外 1L 摇瓶中, 30℃, 200r/min 培养。每 12h 取样测量发酵液生物量和酶活力并按照剩余液体体积每 24h 添加 0.5%(V/V)的甲醇(Tolner *et al*, 2006)。

1.3 脂肪酶的活力测定和蛋白含量测定

分光光度法: 参照 Hatzinikolaou 等(1999)的方法并略作修改, 底物为对硝基苯基月桂酸酯 *p*-nitrophenyl laurate。反应体系为: A 液, 40mg *p*NP-laurate 溶解在 12ml 异丙醇(购自国药集团)中。B 液, 0.1mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲液 100ml 加入 0.4g Triton X-100。A、B 液配好后 4℃冷藏。测活前取 0.1ml A 液和 1.5ml B 液混合后置于 35℃水浴中孵育 3min, 随后加入 50 μl 酶液(以 50 μl , 100℃5min 灭活的酶液为对照)继续水浴 8min, 取出反应液置于冰上终止反应, 在 410nm

1) Invitrogen. pPIC9K, A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression. Catalog No.V175-20. www.invitrogen.com

下测定其吸光值。酶活力单位(U)定义为: 在 35℃, pH 8.0 条件下, 每分钟催化底物水解产生 1.0 μ mol *p*-nitrophenol 所需的酶量。

蛋白含量测定: 采用 Bradford(1976)测定方法, 以牛血清白蛋白为标准物, 制作标准曲线, 回归系数 $R^2=0.9968$ 。

1.4 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 采用 12%分离胶和 5%的浓缩胶, 控制电压在 200V。电泳结束后进行考马斯亮蓝 R-250 染色(Laemmli, 1970)。

1.5 重组脂肪酶的纯化

采用中空纤维素膜超滤浓缩、硫酸铵分级沉淀、Q-sepharose FF (210ml, 30cm \times 3.0cm)阴离子柱和 Sephacryl[®]S-100 (145ml, 60cm \times 1.8cm)凝胶过滤层析柱进行纯化。

1.6 酶学性质的测定

酶学性质主要对重组酶的最适反应温度、热稳定性、最适反应 pH、pH 稳定性等方面加以探索。

最适反应温度: 将反应体系分别在 10—60℃ 范围内, 以 10℃ 为梯度, pH 8.0 条件下反应 8min 后测定其活力, 比较不同温度下的酶活力。当测得最适温度后, 再加测最适温度 \pm 5℃ 时的酶活。以测定酶活最高点温度下的酶活力为 100%, 计算其它温度下酶的相对活力。

热稳定性的测定: 将酶液分别在 0—70℃ 下, 以 10℃ 为梯度保温 30min, 然后在 35℃, pH 8.0 条件下检测酶活力。以在 0℃ 下保存的脂肪酶活力为 100%, 比较不同温度处理后重组酶的残余活力。

脂肪酶反应的最适 pH 及 pH 稳定性实验中用到以下缓冲液: 柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液(pH 3.0—6.2), 磷酸盐缓冲液(pH 5.8—8.0), 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 8.6—10.6), 氯化钾-氢氧化钠缓冲液(pH 11.0—12.0)。

最适反应 pH: 在 pH 3.0—11.0 的缓冲液中, 测定 35℃ 条件下 LipYp 的酶活力, 以 pH 8.0 值下的酶活为 100%, 计算其它 pH 值下的相对活力。

pH 稳定性测定: 将重组脂肪酶液分别在 pH 2.0—12.0 的相应缓冲液体系中 4℃ 保存 24h, 然后 35℃, pH 8.0 条件下对其残余酶活进行测定, 考察酶的 pH 稳定性。

1.7 重组酶的底物特异性

LipYp 的底物特异性实验所用底物为不同脂肪酸链长的对硝基苯酚酯类(C2—C14)和脂肪酸甘油三酯

类(C2—C18)。两类底物的测定方法如下:

对硝基苯酚酯类底物采用分光光度法, 参照 Hatzinikolaou 等(1999)的方法并略作修改。将 30mmol/L 的不同对硝基苯酚酯溶解在 5ml 异丙醇(国药)中, 4℃ 放置。用前取 100 μ l 不同底物溶液分别加入到 1.5ml 100mmol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液中(内含 0.5% Triton X-100), 35℃ 水浴 2min, 随后向各个反应体系中加入等量酶液(约 0.1ml) 35℃ 水浴反应 8min。最后将各反应体系置于冰浴上以终止反应。在 410nm 下测定各反应体系的吸光值, 以对硝基苯基月桂酸酯(C12)反应体系吸光值算得的酶活定义为 100%, 计算其它各反应体系的相对活力。酶活力单位(U)定义为在 35℃, pH 8.0 条件下, 每分钟催化底物水解产生 1.0 μ mol *p*-nitrophenol 所需的酶量。

脂肪酸甘油三酯类底物的测定采用平板透明圈法, 参照 Kouker 等(1987)的方法并略作修改, 其依据为脂肪酶水解不同甘油三酯在甘油三酯琼脂平板上形成的透明圈的面积不同, 根据透明圈半径 R^2 来评估脂肪酶对甘油三酯类底物的特异性。具体方法如下: 50mmol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液, 2.5%(V/V)不同甘油三酯, 7.5%(V/V)聚乙烯醇(PVA, 聚合度 1750 \pm 50), 0.2%维多利亚蓝 B)混合后经超声乳化处理 6min, 分两次, 每次 3min, 间隔 5min。随后加入 2%琼脂, 加热, 每 20ml 乳化液分装至同一规格的平皿内。为定量测定, 统一在每个平板上穿 5 个 3mm 直径的圆孔并注入等量的酶液(50 μ l), 35℃ 下放置 24h。随后测量不同平板上透明圈的半径。计算其 R^2 , R^2 值越大就代表了重组酶对该链长的脂肪酸甘油酯有越好的水解特异性。以三月桂酸甘油酯(trilaurin 12:0)平板的 R^2 为 100%, 计算其它各底物的相对活力。

1.8 重组酶反应动力学常数的测定

LipYp 酶动力学参数 K_m 和 V_{max} 的测定以 *p*-nitrophenyl laurate (C12)为底物, 酶液浓度为 10 μ g/ml。在 pH 8.0, 35℃ 的条件下, 分别将底物浓度稀释到 5—50mmol/L, 测定脂肪酶在不同底物浓度下的酶活。根据 Lineweaver-Burk 方程, 求此条件下 K_m 值和 V_{max} 。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶表达载体的构建和重组酵母的 PCR 鉴定

以 *Y. lipolytica* Bohaisea-9145 基因组为模板, 通过 PCR 方法扩增出一条 1100bp 左右的特异条带, 将该条带回收并测序, 得到一条 1116bp 大小的序列, 将

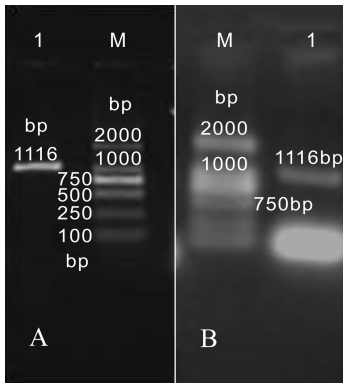


图2 重组质粒的酶切鉴定(A)以及重组酵母的PCR鉴定(B)
Fig.2 Identification of the recombinant plasmid by endonucleases (A) and the recombinant yeast by PCR (B)
M: DNA Marker; A. 1: pPIC9K-lipYp 的双酶切图; B. 1: 特异引物扩增产物

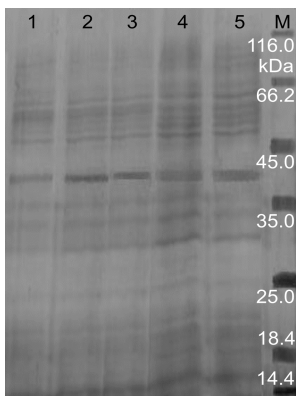


图3 不同发酵时段发酵液上清电泳图

Fig.3 SDS-PAGE analysis of culture supernatants collected at different times in shaking flask cultures
M 为标准蛋白 Marker; 1—5 号表示在诱导产酶开始后第 12、24、36、48、64h 时发酵液上清蛋白含量变化

的发酵液蛋白含量变化如 SDS-PAGE 电泳图 3 所示。从图 3 可以看出, 发酵液上清蛋白条带中, 脂肪酶为主要条带, 重组脂肪酶的表现分子量约为 42kDa, 重组菌在进入甲醇诱导期的约 12h 左右开始产酶。

实验还记录了诱导产酶期间不同阶段的生物量和酶活的变化(图 4)。从图 4 中可以看出, OD_{600} 在诱导期 48h 时达到最大值 32。在诱导期的第 54h 发酵

液酶活达到了最高, 约为 1956U/ml, 生物量 OD_{600} 在第 56h 后逐步降低, 酶活在 60h 后逐步降低。期间不同时段发酵液的 pH 值也同步做了测定(未列具体数据), 在诱导期开始时 pH 自 6.0 逐步升高, 在 48h 时达到最大 7.2, 随后保持平稳, 继而缓慢下降。

该序列与以 Bohaisea-9145 cDNA 基因组 DNA 为模版扩增得到的脂肪酶基因序列进行比较, 二者完全一致, 说明该脂肪酶基因中没有内含子。将该脂肪酶基因编码序列 lipYp 与表达载体 pPIC9K 分别经 *Eco*R 和 *Not* 双酶切后, 再用 T_4 连接酶连接成重组质粒 pPIC9K-lipYp, 转化入 DH5 α 。提取重组质粒酶切鉴定, 结果如图 2A 所示。

2.2 重组菌的摇瓶发酵

GS115 感受态细胞经电转, 于 30 $^{\circ}$ C 培养后, 挑选在 MD 上生长的酵母单菌落于 YPD 培养基中培养, 并提基因组。采用本实验设计的一对特异性引物进行 PCR 扩增, 得到与目的片段相同大小的条带。证明脂肪酶基因已经正确整合到毕赤酵母基因组中。结果如图 2B 所示。

菌体转接入 BMMY 培养基后, 诱导产酶期即开始, 产酶和生物量的记录持续了约 70h。不同时段

的发酵液蛋白含量变化如 SDS-PAGE 电泳图 3 所示。从图 3 可以看出, 发酵液上清蛋白条带中, 脂肪酶为主要条带, 重组脂肪酶的表现分子量约为 42kDa, 重组菌在进入甲醇诱导期的约 12h 左右开始产酶。

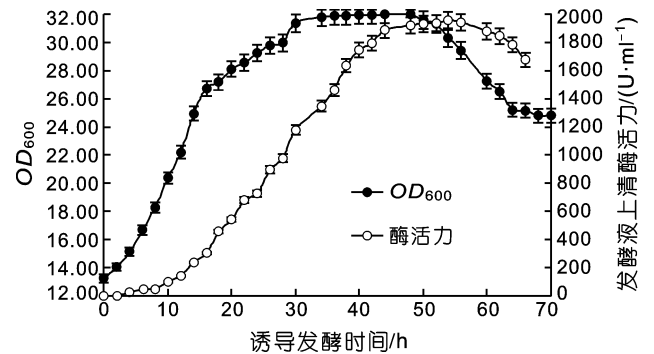


图4 重组菌 GS115-LipYpr 在 1-L 摇瓶内的生长产酶曲线
Fig.4 The growth curve of GS115-LipYpr and the yield of enzyme in 1-litre shake flask

2.3 pH 和温度对重组酶的影响

如图 5A 所示, 脂肪酶作用的最适 pH 为 8.5, 且此酶在 pH 7.0—10.5 的范围内表现出较高活力, 说明 LipYp 在碱性环境下稳定性较好。

图 5B 显示脂肪酶的最适反应温度为 35 $^{\circ}$ C, 在 0—45 $^{\circ}$ C 温度范围内酶活力较为稳定, 当温度升高至 65 $^{\circ}$ C 时, LipYp 已基本失活。将酶于 45 $^{\circ}$ C 放置 1h, 剩余酶活力高于 70%, 说明此酶具有一定的耐热性。

国内外已有研究报道, 低温酶是一类作用最适温度为 30 $^{\circ}$ C 左右, 并在 0 $^{\circ}$ C 时同样能够保持较高活力的酶(Margesin *et al*, 1999)。Joseph 等(2008)的研究表明来至于微生物的低温脂肪酶的最适反应温度为 20 $^{\circ}$ C, 且在 65 $^{\circ}$ C 以上时性质不稳定。曾胤新等(2004)认为来至低温环境及嗜冷微生物产生的低温酶最适作用温度应该在 25—45 $^{\circ}$ C 之间。LipYp 的最适反应温度为 35 $^{\circ}$ C, 且在 45 $^{\circ}$ C 时也表现出活力, 说明此酶是一种低温脂肪酶。

由以上数据显示, LipYp 在 pH 7.0—10.5, 温度 20—35 $^{\circ}$ C 时能够保持较高的活力, 说明此酶是一种较耐碱的低温脂肪酶。

2.4 重组酶的底物特异性

脂肪酶底物特异性是脂肪酶的一个重要特性。一般来自于微生物脂肪酶的底物特异性较高, 而不同特异性的脂肪酶在工业中的应用也不同。本研究中 LipYp 对不同脂肪酸链长的对硝基酚酯类显示不同的活力。如表 1, LipYp 对葵酸酯(C10)和月桂酸酯(C12)

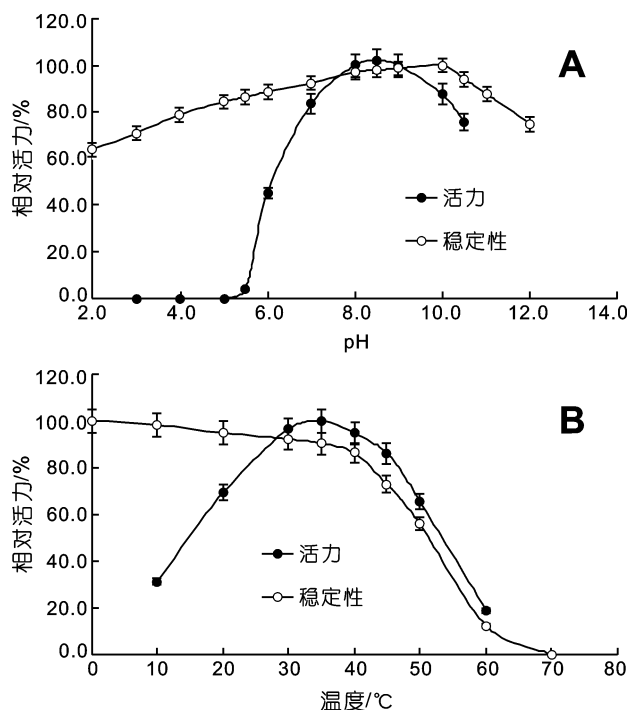


图5 重组脂肪酶的最适反应 pH 和 pH 稳定性(A)以及最适反应温度和热稳定性(B)

Fig.5 Effect of pH on the activity and stability (A), heat stability and optimum temperature (B) of the purified recombinant lipase

注: 最适反应 pH 实验以 pH 8.0, 35°C 条件下酶活为 100% 对照。A. pH 稳定性实验以 pH 10.0 下的残余活力为 100% 对照; B. 热稳定性实验以 0°C 下的残余活力为 100% 对照

具有很高的水解活力, 这显示 LipYp 对中长链脂肪酸酯的水解活力较高。但 LipYp 对短链脂肪酸酯如醋酸酯(C2)和丁酸酯(C4)以及更长碳链的肉豆蔻酸酯(C14)却显示了较低的水解活力(表 1)。

对于不同的脂肪酸甘油酯类底物的水解, LipYp

显示出对三月桂酸甘油酯(12:0)有很强的水解活力, 当脂肪酸链长增加或减少时水解活力均显示降低(表 1)。同时, LipYp 对不饱和的甘油三酯复合物——橄榄油显示了最低的水解活力。脂肪酶水解甘油三酯是一个多级反应, 其包括甘油三酯、甘油二酯、单甘油酯的水解(Fickers *et al.*, 2011)。本实验仅根据 Han 等(1986)提出的简单模型, 测定了重组酶对三甘油酯水解的表观参数。

LipYp 对中长链(C10)脂肪酸酯的水解活力较高, 显示出 LipYp 是真正的脂肪酶(Rahman *et al.*, 2003)。而对于 C14—C18 类的对硝基酚酯, 由于它们在反应体系中的溶解度很低, 造成体系浑浊干扰了吸光值测定, 因此作者在本实验中未采用 *p*-Nitrophenyl palmitate (C16)和 *p*-Nitrophenyl stearin (C18)的数据。

2.5 重组酶的动力学参数

K_m 值可以近似反映酶与底物的亲和力大小, 其值越低表示该酶与底物的亲和力越强(Sharma *et al.*, 2001)。与相同类型的嗜温和嗜热酶相比, 低温酶的 K_m 值低, 表示低温酶对底物具有更高的亲和力和催化效率(曾胤新等, 2004)。Hatzinikolaou 等(1999)报道了以 *p*-nitrophenyl laurate 为底物, 测定 *Rhodotorula glutinis* 的脂肪酶 K_m 为 0.7mmol/L。以 *p*NPP 为底物, 由 *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 菌株产生的脂肪酶, 其 K_m 和 V_{max} 值分别为 18.18 μ mol/L、0.09 μ mol/(min·mg) (Sathish Yadav *et al.*, 2011)。

本实验结果显示 LipYp 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 (0.582 \pm 0.018) μ mol/L、(124 \pm 12.5) μ mol/(min·mg) (*p*-Nitrophenyl laurate 为底物), 与 *Rhodotorula glutinis* (Hatzinikolaou *et al.*, 1999), *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 (Sathish Yadav *et al.*, 2011)的脂肪酶相比较,

表 1 重组酶的底物水解特异性
Tab.1 Hydrolytic specificity of the recombinant lipase

底物(<i>p</i> -Nitrophenyl esters)	相对酶活力(%)	底物(Triglycerides)	相对酶活力(%)
<i>p</i> -Nitrophenyl acetate (C2)	25.38	Triacetin (C2:0)	23.21
<i>p</i> -Nitrophenyl butyrate (C4)	35.84	Tributylin (C4:0)	33.69
<i>p</i> -Nitrophenyl caproate (C6)	57.88	Tricaproin (C6:0)	43.45
<i>p</i> -Nitrophenyl caprylate (C8)	70.20	Tricaprylin (C8:0)	55.36
<i>p</i> -Nitrophenyl caprate (C10)	121.00	Tricaprin (C10:0)	61.67
<i>p</i> -Nitrophenyl laurate (C12)	100.00	Trilaurin (12:0)	100.00
<i>p</i> -Nitrophenyl myristate (C14)	32.84	Trimyristin (C14:0)	62.74
		Tripalmitin (16:0)	47.02
		Tristearin (18:0)	38.69
		Olive oil	5.95

LipYp 对底物的亲和力更好且催化活力更高。

3 结语

虽然前期已有许多关于陆生耶氏酵母脂肪酶的报道(Fickers *et al*, 2011), 但自海洋中筛选的产脂肪酶的 *Yarrowia lipolytica* 却鲜有报道。Kim 等(2007)从海洋油污污染区域分离得到一株产脂肪酶菌株 *Y. lipolytica* CL180, 此菌株产的脂肪酶/酯酶反应的最适条件是 pH 7.5, 35℃, 且分解短链脂肪酸酯的能力较强(C 10)。Sathish Yadav 等(2011)新发现了一株产低温酸性脂肪酶/酯酶的耶氏酵母菌株——*Yarrowia lipolytica* NCIM 3639。该菌株所产酶的最适反应条件为 pH 5.0, 25℃, 且该酶对 *p*-NP caprylate (C8)的水解活力最高。与上述发现的海洋环境的耶氏酵母所产脂肪酶相比, 则重组菌所产脂肪酶的性质有所不同。

本研究对菌株 *Yarrowia lipolytica* BohaiSea-9145 产脂肪酶基因进行了克隆, 并构建了 pPIC9k-*lipYp* 表达载体, 将克隆得到的脂肪酶基因利用真核表达体系在巴斯德毕赤酵母(GS115)中进行了高效表达。经过 64h 培养, 发酵液上清中脂肪酶活力达到 1956U/ml。SDS-PAGE 实验证实此发酵液中主要的蛋白是重组脂肪酶。纯化后对其特性进行研究, LipYp 的最适反应温度和最佳反应 pH 分别是 35℃, 8.5, 且 LipYp 在 pH 7.0—10.5, 温度不高于 45℃时, 均有较好的稳定性。酶反应动力学和底物特异性实验表明, 重组酶底物亲和性比较好, 且 LipYp 对长链脂肪酸酯有较强的水解能力, 特别是对 *p*-Nitrophenyl caprate (C10)和 trilaurin (12:0)的分解效果最佳。

参 考 文 献

- 于 平, 2005. 巴斯德毕赤酵母表达系统研究进展. 工业微生物, 35(3): 50—54
- 张金伟, 曾润颖, 2006. 南极深海沉积物宏基因组 DNA 中低温脂肪酶基因的克隆、表达及性质分析. 生物化学与生物物理进展, 33(12): 1207—1214
- 邵铁娟, 孙 谧, 郑家声等, 2004. Bohaisea-9145 海洋低温碱性脂肪酶研究. 微生物学报, 44(6): 789—793
- 徐同成, 李 霞, 马晓航等, 2009. 南极假丝酵母(*Candida antarctica*)脂肪酶 A 在毕赤酵母中的表达、纯化及性质. 科技通报, 25(3): 255—259
- 董宏伟, 孙 谧, 王跃军等, 2004. 海洋微生物低温碱性脂肪酶的纯化与性质研究. 海洋与湖沼, 35(4): 376—383
- 曾胤新, 俞 勇, 蔡明宏等, 2004. 低温微生物及其酶类的研究概况. 微生物学杂志, 24(5): 83—88
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248—253
- Daly R, Hearn M T, 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Molec Recog, 18: 119—138
- Fickers P, Marty A, Nicaud J M, 2011. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. Biotechnology Advances, 29: 632—644
- Han D, Rhee J S, 1986. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. Biotechnol Bioeng, 28: 1250—1255
- Hatzinikolaou D G, Kourentzi E, Stamatis H *et al*, 1999. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. J Biosci Bioeng, 8: 53—56
- Joseph B, Ramteke P W, Thomas G, 2008. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. Biotechnology Advances, 26: 457—470
- Kim J T, Kang S G, Woo J H *et al*, 2007. Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. Appl Microbiol Biotechnol, 74: 820—828
- Kouker G, Jaeger K E, 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. Appl Environ Microbiol, 53: 211—213
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, 227: 680—685
- Margesin R, Schinner F, 1999. Cold-adapted organisms-ecology, physiology, enzymology and molecular biology. Berlin: Springer, 416
- Nicaud J M, Madzak C, Broek P *et al*, 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research, 2: 371—379
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, New York, 1—1659
- Sathish Yadav K N, Adsul M G, Bastawde K B *et al*, 2011. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. Biore-source Technology, 102: 10663—10670
- Song H T, Jiang Z B, Ma L X, 2006. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. Protein Expr Purif, 47: 393—397
- Tolner B, Smith L, Richard H J Begent *et al*, 2006. Production of recombinant protein in *Pichia pastoris* by fermentation. Nature Protocols, 1(2): 1006—1021
- Yu M, Lange S, Richter S *et al*, 2007. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. Protein Expr Purif, 53: 255—263

AN ALKALINE LIPASE FROM *YARROWIA LIPOLYTICA* BOHAISEA-9145: GENE CLONING, HETEROLOGOUS EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION

LI Zhong-Lei^{1,2}, WANG Yue-Jun¹, SHENG Jun¹, LIU Jun-Zhong¹, SUN Mi¹
(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071;
2. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract A pair of primers were designed according to the nucleotide sequence of the alkaline lipase gene (*lipYp*, 1116bp in length) from psychrotrophic marine yeast *Yarrowia lipolytica* BohaiSea-9145. The *lipYp* sequence was subcloned into expression vector pPIC9K and successfully integrated into a heterologous fungal host *Pichia pastoris* GS115. Recombinant yeast was obtained by minimal dextrose and minimal methanol plates and confirmed by PCR. In shake-flask cultivation, the enzyme activity was 1956U/ml after induction by methanol for 54h. After fermentation, the recombinant lipase was purified, and SDS-PAGE analysis showed the purified lipase was of high purity. The recombinant lipase showed high lipolytic activity in the range of pH 7.0—10.5. The optimal temperature and pH value for the lipases activity were 35°C and 8.5, respectively. Additionally, the enzyme hydrolyzed *p*-nitrophenyl caprate (C10) at the highest hydrolysis efficiency among the other *p*-nitrophenyl esters. The lipase showed high activity toward long-chain fatty acid esters (C10—C12) and toward *p*-nitrophenyl esters.

Key words *Yarrowia lipolytica* Bohaisea-9145, *Pichia pastoris* GS115, Gene clone, Heterologous expression, Characterization

中国海洋湖沼学会 2011 年理事会圆满召开

中国海洋湖沼学会 2011 年理事会,于 2011 年 12 月 28 日在青岛中国科学院海洋研究所召开,刘瑞玉院士、秦蕴珊院士、管华诗院士以及来自全国各地涉海单位的理事、常务理事、学会所属学术期刊编辑部主任、分支机构负责人等 60 余人参加了会议,会议由学会副理事长兼秘书长孙松主持。

会议首先由相建海理事长作学会 2011 年工作总结报告,随后李毅萍副秘书长作了学会 2011 年财务报告;《湖泊科学》编辑部主任李万春、《水生生物学报》编辑部主任杜新征、《海洋与湖沼》编辑部主任陈溥远、《中国海洋湖沼学报》编辑部主任虞子冶,分别就各自期刊的运行情况向理事们做了大会总结汇报。

会议就中国海洋湖沼学会换届选举及召开第十次会员代表大会等事宜进行了讨论,并决定中国海洋湖沼学会第十次会员代表大会将于 2012 年 10 月中旬在青岛召开。

最后常务理事李乃胜就“曾呈奎海洋科技奖”评奖事宜做了通报,2012 年“曾呈奎海洋科技奖”颁奖仪式将在中国海洋湖沼学会第十次会员代表大会上举行。