

黑曲霉 C112 脂肪酶基因的克隆及异源表达优化

徐鹏钧^{1,2}, 曾柏全^{1,2}, 肖志红³, 李美群^{1,3}, 张 轩^{1,3}, 李培旺³, 赵茜彤¹, 颜丽安¹

(1. 中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 长沙 410004; 2. 木本油料资源利用全国重点实验室, 中南林业科技大学, 长沙 410004; 3. 木本油料资源利用全国重点实验室, 湖南省林业科学研究院, 长沙 410004)

摘要:旨在为脂肪酶的改性及其工业化应用提供参考, 基于黑曲霉 C112 菌株通过 PCR 扩增得到脂肪酶基因, 对该基因进行了生物信息学分析, 并运用基因工程技术构建了毕赤酵母 GS115 重组菌, 对该重组菌诱导产生的脂肪酶进行了纯化, 分析了该脂肪酶的酶学性质, 并通过单因素实验和响应面实验对该重组菌产酶条件进行了优化。结果表明: 该脂肪酶基因片段长度为 894 bp, 理论分子质量为 31.79 kDa, 其氨基酸序列中存在一个新的五肽基序 RHSLG; 该脂肪酶最适反应温度和 pH 分别为 40℃ 和 4, 具有良好的热稳定性和 pH 稳定性; 重组菌最佳产酶条件为 YNB 添加量 10.50 mL (100 mL BMMY 培养基中)、接种量 4.3%、每隔 24 h 添加 1% 甲醇、培养时间 2.8 d, 优化条件下所得重组脂肪酶活性达到 78.92 U/mL, 是优化前的 1.79 倍。综上, 经克隆、异源表达优化的重组脂肪酶稳定性强、酶活性高。

关键词:黑曲霉 C112; 脂肪酶; 毕赤酵母; 生物信息学; 克隆

中图分类号: Q939.97; Q812 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2025)04-0073-09

A novel lipase gene of *Aspergillus niger* C112 cloning, and heterologous expression optimization

XU Pengjun^{1,2}, ZENG Baiquan^{1,2}, XIAO Zhihong³, LI Meiqun^{1,3}, ZHANG Xuan^{1,3}, LI Peiwang³, ZHAO Xitong¹, YAN Li'an¹

(1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 2. State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China; 3. State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, China)

Abstract: To provide a reference for the modification of lipase and its industrial application, the lipase gene was amplified by PCR based on the *Aspergillus niger* C112 strain, and the gene was analyzed by bioinformatics. The recombinant *Pichia pastoris* GS115 strain was constructed by genetic engineering techniques, and the lipase induced by the recombinant strain was purified and its enzymatic properties were analyzed. In addition, the lipase production conditions with the recombinant strain were optimized through single factor experiment and response surface methodology. The results indicated that the length of the lipase gene fragment was 894 bp, and its theoretical molecular weight was 31.79 kDa. A new pentapeptide RHSLG was found in its amino acid sequence. The optimal reaction temperature and pH of the recombinant lipase were 40℃ and 4, respectively, which showed good thermal stability and pH

stability. The optimal production conditions of the recombinant strain were 10.50 mL of YNB added in 100 mL BMMY medium, inoculation amount 4.3%, adding 1% methanol every 24 h, and a culture time of 2.8 d. Under the optimal conditions, the enzyme activity of the recombinant lipase reached 78.92 U/mL, which was 1.79 times that

收稿日期: 2024-10-29; 修回日期: 2025-02-12

基金项目: 木本油料资源利用全国重点实验室基金项目 (GZKF202107); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20220722)

作者简介: 徐鹏钧 (1998), 女, 硕士研究生, 研究方向为生物资源学 (E-mail) 18628321798@163.com。

通信作者: 曾柏全, 教授, 博士生导师 (E-mail) baiquanzhn@163.com。

before optimization. In summary, the recombinant lipase after cloning and heterologous expression has strong stability and high enzyme activity.

Key words: *Aspergillus niger* C112; lipase; *Pichia pastoris*; bioinformatics; cloning

微生物脂肪酶在水和非水环境中能催化多种化学反应,具有重要的工业价值^[1-2],其在食品、皮革加工、化妆品、造纸和洗涤剂^[3]行业得到了广泛应用,并且在生物传感器、农药和生物修复方面^[4]也有一定应用。脂肪酶的特性受其结构的影响较大^[5-6]。Gutiérrez - Domínguez 等^[7]研究发现,五肽基序是发挥脂肪酶活性的关键位点,其中任何氨基酸残基的取代都会影响脂肪酶的催化性能。Guo 等^[8]研究发现,丝氨酸(Ser)、天冬氨酸(Asp)和组氨酸(His)的催化三联体是维持脂肪酶活性所必需的。

对不同菌株脂肪酶基因的克隆与研究,不仅有助于了解其结构与性质的关联性,还为脂肪酶的工业化定向改造提供了基础,以期开发出使用条件更温和的脂肪酶。此外,通过异源表达脂肪酶基因,不仅可以获得高产率的重组菌,且重组脂肪酶更易于分离纯化。黑曲霉是工程细菌靶基因的主要来源^[9],基因组测序显示其存在大量分泌表达的脂肪酶基因^[10]。本研究对黑曲霉 C112 脂肪酶基因进行克隆,分析其生物信息学,并成功在毕赤酵母 GS115 中实现了该基因的异源表达,同时对产酶体系进行了优化,以期为脂肪酶的改性及其工业化应用提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

黑曲霉 C112(黑曲霉 30786 的紫外诱变菌株),本实验室保存;毕赤酵母 GS115、质粒 pPIC9K,生工生物工程上海股份有限公司。

1.1.2 生化试剂和工具酶

pUCm-T、EcoR I、T₄DNA 连接酶、RNA 提取试剂盒,生工生物工程上海股份有限公司;Not I 和 LA Taq, Takara Bio 公司;EasyTaq PCR SuperMix,北京全式金生物公司;DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小型提升试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 培养基和溶液

PDA 固体培养基:马铃薯浸出粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 18 g/L,pH 自然。PDB 液体培养基:马铃薯浸出粉 5 g/L,葡萄糖 20 g/L,pH 自然。LB 液

体培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,pH 7.4。LB 固体培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母提取物 5 g/L,NaCl 10 g/L,琼脂 18 g/L,pH 7.4。MD 培养基:酵母基础氮源(YNB)13.4 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L,质量浓度为 0.4 mg/L 经过滤和净化的生物素 0.2 mL/L。BMMY 培养基(100 mL):1 g 酵母粉,2 g 蛋白胨,0.2 mL 0.02% 生物素,10 mL 磷酸盐缓冲液(pH 6.0)。

镍(Ni)柱蛋白纯化洗脱剂(1 000 mL):2.422 8 g Tris,29.22 g NaCl,30.04 g 咪唑,100 g 甘油,pH 8.0,过滤除菌。

pH 2.0~8.0 的 25 mmol/L 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(1 000 mL):7.098 g 磷酸氢二钠,用 1 mol/L 柠檬酸调节 pH 分别至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。

聚乙烯醇(PVA)溶液:40 g PVA,加 800 mL 水,加热搅拌至完全溶解,冷却后定容至 1 000 mL,用多层纱布过滤,所得滤液即 PVA 溶液。

橄榄油乳化液:取 PVA 溶液和橄榄油按照体积比 3:1 混合,使用高速匀浆机处理 3 min,间隔 5 min 后再处理 3 min,得到橄榄油乳化液,现配现用。

磷酸盐缓冲液(pH 7.5):磷酸氢二钾 1.96 g,磷酸氢二钠 39.62 g,用水溶解并定容至 500 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计

参照 GenBank 中黑曲霉脂肪酶基因的同源序列(登录号为 XM_001397464.2),使用 SnapGene 设计扩增基因的引物,其中上游引物 F 序列为 5'-GGAATTCATGTTCTTCTGGCGTTTGG-3'(划线部分为 EcoR I 酶切位点,在引物的 5'端),下游引物 R 序列为 5'-GCGGCCGCCTATAGCAGACACTCTGAAA-3'(划线部分为 Not I 酶切位点,在引物的 5'端)。上述 2 种引物均由生工生物工程上海股份有限公司合成。

1.2.2 黑曲霉 C112 RNA 的提取及 PCR 扩增

按照 RNA 提取试剂盒的操作说明提取黑曲霉 C112 中总 RNA,再采用逆转录-聚合酶链(RT-PCR)反应合成 cDNA。RT-PCR 反应程序:将 1 μL 基因组 DNA 清除试剂、2 μL 5 倍的基因组 DNA 清除缓冲液和 7 μL 总 RNA 混合后在 42℃ 下反应 2 min,然后冷却至 4℃,取 10 μL 上述反应液、1 μL

逆转录酶混合物、1 μL RT 引物混合物、4 μL 5 倍反应缓冲液混合物和 4 μL 无酶水混合后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下逆转录反应 15 min, 然后立即置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 5 s。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增(扩增条件:在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下初步变性 5 min, 在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 1 min, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下退火 1 min, 在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 1 min, 以 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min 到 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 这个过程作为循环节完成 30 个循环, 最终在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min 以补齐末端), 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳(电泳条件为 100 V、25 min)分离, 以没有任何模板 DNA 的 PCR 混合物为阴性对照, 黑曲霉脂肪酶基因序列(XM_001397464.2)为阳性对照进行分析。将电泳分离的目的条带切下, 装入离心管中, 使用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的条带, 得到黑曲霉 C112 脂肪酶基因 PCR 扩增产物。

1.2.3 脂肪酶的生物信息学分析

1.2.3.1 脂肪酶基因测序

将黑曲霉 C112 脂肪酶基因 PCR 扩增产物克隆至 pUCm-T 载体[在基因克隆前, 在脂肪酶基因序列 C 段添加蛋白纯化标签 6 \times 组氨酸(His)], 转化大肠杆菌 DH5 α , 用蓝白斑法筛选重组体, 集落 PCR 验证重组体, 摇瓶培养验证阳性重组体, 酶切提取质粒, 阳性载体的菌液送至北京华大基因公司进行序列测定。

1.2.3.2 脂肪酶系统发育分析

利用 Blast 工具对脂肪酶的基因序列进行相似性分析, 选取部分同源序列, 利用 Clustal X 进行同源进化比较, 构建系统发育树。

1.2.3.3 脂肪酶的氨基酸序列分析以及蛋白质二级结构和三级结构的预测分析

通过软件 Snapgene 将 1.2.2 中黑曲霉 C112 脂肪酶 mRNA 翻译为氨基酸序列, 用 Blast 在线工具完成氨基酸序列同源比对。通过在线软件(<https://web.expasy.org/protparam/>)对黑曲霉 C112 脂肪酶氨基酸序列进行分析, 通过在线软件对脂肪酶蛋白质二级结构(<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-auomat.pl/page=/NPSA/npsa-hnn.html>)、三级结构(<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>)及信号肽(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>)等信息进行预测分析。

1.2.4 重组毕赤酵母 GS115-重组脂肪酶基因的构建

使用 T₄DNA 连接酶通过 AT 克隆的方法将目的基因连接到克隆载体中, 将克隆载体导入大肠杆

菌感受态细胞, 采用蓝白斑法在 LB 平板(包含 IPTG、X-gal、氨苄青霉素)上对转化子进行初步筛选, 并通过菌落 PCR 的方法对其进行验证, 选择菌落 PCR 呈阳性的菌落, 培养于 LB 液体培养基(含有氨苄青霉素)中, 培养 16 h, 以质粒 pPIC9K 作为脂肪酶基因的表达载体, 通过双酶切方法成功构建表达载体 pPIC9K-重组脂肪酶基因。通过电转化的方法将 pPIC9K-重组脂肪酶基因导入至毕赤酵母 GS115 中, 通过菌落 PCR 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 成功构建毕赤酵母 GS115-重组脂肪酶基因重组菌。

1.2.5 重组脂肪酶的诱导表达与纯化

将阳性重组菌接种于 BMMY 培养基中(100 mL BMMY 培养基中添加 10 mL YNB), 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下孵育 24 h, 之后每 24 h 添加 1% 甲醇进行诱导培养(诱导培养条件为预实验优化), 诱导培养 72 h 后取 2 mL 溶液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、11 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液(甲醇诱导上清液)。为了验证重组脂肪酶成功表达和鉴定甲醇诱导表达, 向甲醇诱导上清液中加入 200 μL 的 TCA 溶液(500 g/227 mL), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下沉淀过夜, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、11 000 r/min 下离心 10 min 收集沉淀。向沉淀中加入 200 μL 丙酮洗涤沉淀, 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、11 000 r/min 下离心 10 min, 倒出上清液, 将离心管置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘干 20 min, 随后加入 20 μL 1 \times loading buffer 重悬溶解, 沸水浴 5 min, 进行 SDS-PAGE(12% 分离胶、5% 浓缩胶、电压 120 V)分析, 同时以无甲醇诱导作为对照。

重组脂肪酶的纯化: 向上清液(甲醇诱导上清液)中加入硫酸铵, 使其达到 75% 的饱和度(硫酸铵分 20 次加入, 每次待其完全溶解后再加入), 所有硫酸铵加入后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜, 在 10 000 r/min 下离心 10 min, 得到蛋白沉淀。用少量磷酸盐缓冲液重新溶解蛋白沉淀, 低温、6 000 r/min 下离心 5 min, 除去沉淀, 将上清液加入透析袋中, 预留 1/2 空间, 4 $^{\circ}\text{C}$ 透析, 透析外液为磷酸盐缓冲液, 中途更换 2 次磷酸盐缓冲液, 透析 24 h 后得到粗酶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 短期保存, -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。然后对粗酶液进行镍柱纯化(因克隆前加入了 His 标签, 故可以被镍柱亲和吸附, 从而纯化、分离重组脂肪酶)。镍柱纯化的具体操作: 取适量 Ni-NTA 树脂加入离心管中, 以 3 000 r/min 离心 2 min, 倒出上清液, 加入 2 倍体积的 Binding/Wash 缓冲液, 充分混合后再以 3 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 得到预处理后的树脂。将粗酶液与 Binding/Wash 缓冲液按体积比 1:1 混合, 将混合物与预处理后的树脂混合 30 min。将该混合

物以 3 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液, 用 2 倍体积的 Binding/Wash 缓冲液洗涤树脂, 再以 3 000 r/min 离心 2 min, 去除上清液。反复洗涤, 直至洗涤液在 280 nm 处的吸光度达到基线值。用 1 倍树脂体积的洗脱剂洗脱蛋白(带 His 标签), 以 3 000 r/min 离心 2 min, 仔细吸取保留上清, 重复洗脱 2 次, 分别储存洗脱液(纯化的酶液)。

1.2.6 脂肪酶活性检测

取 2 个 50 mL 的 Erlenmeyer 烧瓶, 分别标记为对照烧瓶(A)和样品烧瓶(B), 向 2 个烧瓶中分别加入 4 mL 橄榄油乳化液和 5 mL 磷酸盐缓冲液, 在烧瓶 A 中加入 15 mL 95% 乙醇。烧瓶 A 和烧瓶 B 于 40 °C 水浴 10 min 后, 立即加入 1 mL 酶液, 计时 15 min, 立即向烧瓶 B 中加入 15 mL 95% 乙醇终止反应。取出烧瓶后, 在 2 个烧瓶中分别滴入 2 滴酚酞指示剂, 用 0.05 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至 30 s 后呈红色不褪色, 并记录烧瓶 A 和烧瓶 B 消耗的氢氧化钠标准溶液的体积, 按公式(1)计算酶活性, 其中酶活性单位的定义为在一定的反应条件下, 每分钟水解橄榄油生成 1 μmol 可滴定脂肪酸的量定义为 1 个酶活性单位, 用 U 表示。

$$Y = \frac{(V_{\text{样}} - V_{\text{空}}) \times 10^{-3} \times C_{\text{NaOH}} \times 10^6}{t} \times N \quad (1)$$

式中: Y 为酶活性, U; $V_{\text{样}}$ 为样品滴定氢氧化钠消耗量, mL; $V_{\text{空}}$ 为对照滴定氢氧化钠消耗量, mL; t 为反应时间, min; C_{NaOH} 为氢氧化钠的浓度, mol/L; N 为酶液的稀释倍数。

1.2.7 重组脂肪酶的酶学性质分析

重组脂肪酶最适温度的测定: 以橄榄油乳化液为底物, 磷酸盐缓冲液为反应缓冲液, 在 30 ~ 60 °C 范围内, 以 5 °C 为间隔, 按 1.2.6 的方法测定不同温度下重组脂肪酶的活性, 所有实验均重复 3 次。将不同温度下测得的最大酶活性设为 100%, 其他温度下的酶活性测定值与其比较获得相对酶活性。

重组脂肪酶的温度稳定性测定: 将重组脂肪酶样品分多管(3 mL/管), 在 35、40、45、50 °C 时分别水浴 1、10、30、45、60 min 后, 冷却至室温, 按 1.2.6 方法测定酶活性。将不同温度下未经孵育样品的酶活性设为 100%, 不同温度下孵育样品的酶活性测定值与其比较获得相对酶活性。

重组脂肪酶最适 pH 的测定: 以橄榄油乳化液为底物, 以不同 pH(pH 2.0 ~ 8.0) 的 25 mmol/L 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液为反应缓冲液, 在最适反应温度下, 按 1.2.6 的方法测定重组脂肪酶的活性。所有实验重复 3 次。将不同 pH 下测得的最大酶活

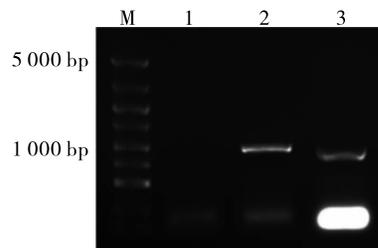
性设为 100%, 其他 pH 下的酶活性测定值与其比较获得相对酶活性。

重组脂肪酶 pH 稳定性的测定: 将重组脂肪酶样品分多管(3 mL/管), 在 pH 2 ~ 8、4 °C 条件下孵育 48 h, 取出后按 1.2.6 的方法测定酶活性。将不同 pH 下未经孵育样品的酶活性设为 100%, 不同 pH 下孵育样品的酶活性测定值与其比较获得相对酶活性。

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶基因的克隆

对黑曲霉 C112 脂肪酶基因 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果如图 1 所示。将经琼脂糖凝胶纯化后的黑曲霉 C112 脂肪酶基因 PCR 扩增产物连接到 pUCm - T 载体上, 筛选培养阳性克隆, 提取质粒, 并进行双酶切验证, 结果如图 2 所示。

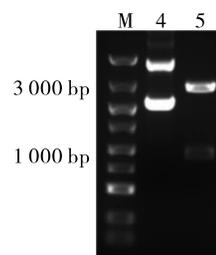


注: M. DL5000 Marker; 1. 阴性对照; 2. 扩增产物; 3. 阳性对照

Note: M. DL5000 Marker; 1. Negative control; 2. Amplification product; 3. Positive control

图 1 脂肪酶基因的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 PCR amplification product electrophoresis (agarose gel) of lipase gene



注: M. DL5000 Marker; 4. 完整质粒 pUCm - T - 重组脂肪酶基因; 5. 双酶切 pUCm - T - 重组脂肪酶基因

Note: M. DL5000 Marker; 4. Plasmid pUCm - T - recombinant lipase gene; 5. pUCm - T - recombinant lipase gene digested by Not I and EcoR I

图 2 pUCm - T - 重组脂肪酶基因克隆载体双酶切产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoresis (agarose gel) of double digestion products of pUCm - T - recombinant lipase gene cloning vector

由图 1 可知, 黑曲霉脂肪酶基因 PCR 扩增片段长度约为 900 bp, 符合预期。由图 2 可知, 目的基因成功插入到了载体中。

2.2 脂肪酶的生物信息学

2.2.1 脂肪酶基因序列

脂肪酶基因片段长度为 894 bp, 被命名为 lipaseCOA, GenBank 登录号为 OP562898.1。该基因有 201 个 A、201 个 T、251 个 G、241 个 C, C 与 G 的总含量为 55.03%。该基因编码 297 个氨基酸, 以 ATG 为起始密码子, 并以一个终止密码子结束。该基因序列与美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 已发表的黑曲霉脂肪酶基因序列 (XM_001397464.2) 相似度达 99.89%。因此, 所获得的基因就是本研究所需要的脂肪酶基因序列。

2.2.2 脂肪酶基因的系统发育

Blast 同源性检索结果表明, 黑曲霉 C112 脂肪酶基因与黑曲霉脂肪酶基因 (GenBank 登录号为 XM_001397464.2) 具有高度同源性。利用 MEGA11 软件中的 Maximum likelihood 法对相似度较高的曲霉脂肪酶氨基酸序列进行了系统发育分析, 证实了克隆获得的基因为黑曲霉 C112 脂肪酶基因。PFam (<http://pfam.xfam.org/>) 工具证实了克隆获得的基因是黑曲霉脂肪酶基因。

2.2.3 脂肪酶的氨基酸序列分析以及蛋白质二级结构和三级结构预测

通过在线软件 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对黑曲霉 C112 脂肪酶的氨基酸序列进行了分析, 结果表明: 脂肪酶的理论分子质量为 31.79 kDa; 预测的等电点为 4.54; 分子式为 $C_{1412}H_{2158}N_{368}O_{447}S_{11}$; 不稳定性系数为 34.53, 属于物理性质稳定的蛋白质; 疏水性平均值 (GRAVY) 为 0.065, 属于疏水性蛋白质; 酸性氨基酸残基 [天冬氨酸 (Asp) + 谷氨酸 (Glu)] 的总数为 31, 碱性氨基酸残基 [精氨酸 (Arg) + 赖氨酸 (Lys)] 的总数为 16, 表明其为酸性蛋白质; 20 种氨基酸中丙氨酸 (Ala) 含量最高, 为 11.8%, 其次是亮氨酸 (Leu), 为 10.4%; 脂肪族指数为 83.97; 体外半衰期为 30 h, 在酵母中为 20 h。

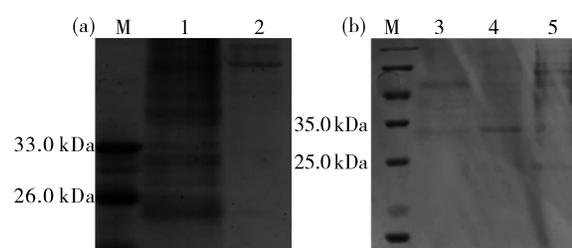
采用在线软件 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>) 分析脂肪酶的信号肽位点, 结果发现, 1~19 位氨基酸可能是该脂肪酶蛋白的信号肽区域。采用在线软件 (SOPMA, <http://www.ibcp.fr/predict.html>) 预测脂肪酶蛋白质二级结构, 结果发现, α -螺旋占 34.34%, β -折叠占 15.49%, 无规卷曲占 50.17%。该脂肪酶含有高比例的 α -螺旋, 有助于维持其主体结构稳定性^[11]。

使用自动比较蛋白质建模服务器 SWISS-MODLE, 以蛋白质数据库中已知的脂肪酶三级结构

(PDB 登录号为 6UVN) 作为模板, 对目标蛋白质进行同源建模, 发现该脂肪酶蛋白质的三维结构与目前已知的脂肪酶三维结构类似, 具有 77% 的相似性, 说明建模结果较可靠。通过序列比较发现, 目标蛋白质中存在一个五肽基序 (171~175 位的氨基酸), 这个基序在已知的脂肪酶中通常是 GXSXG 和 AXSXG^[9], 而在本研究中这个五肽基序从 G 到 R 发生突变, 形成了 RHSLG, 在 PROSITE 数据库中搜索 lipaseCOA, 没有发现五肽基序 RHSLG, 说明 RHSLG 是一个新的五肽基序。五肽基序中氨基酸的不同, 可以作为区分脂肪酶类型的标志^[12]。五肽基序的变化对脂肪酶的稳定性和活性有一定的影响, 工业上会对脂肪酶五肽基序进行修饰以改善其应用^[13]。分析发现, 该脂肪酶的氧阴离子孔区为 VVAFRGS, 结构盖区为 STIKNWIADLD, 盖子结构在一定程度上使脂肪酶更稳定。模型分析证实了该脂肪酶的催化三联体由丝氨酸 (Ser)、Asp、His 氨基酸残基组成, 并且预测的二硫键也得到了确认, 二硫键有利于脂肪酶结构的稳定^[14]。模型显示, 该脂肪酶外部是疏水的, 内部是亲水的, 有助于其在油水界面上的作用。

2.3 重组脂肪酶的诱导表达、纯化及 SDS-PAGE 的分析

按 1.2.5 方法, 在接种量 4% 条件下, 对阳性重组菌进行孵育、诱导培养、离心得到上清液, 再经纯化后得到重组脂肪酶。诱导表达和纯化过程中重组脂肪酶的 SDS-PAGE 图谱见图 3, 脂肪酶活性变化见表 1。



注: M. 蛋白质 Marker; 1. 甲醇诱导上清液 (经 TCA、丙酮处理); 2. 无甲醇诱导上清液 (经 TCA、丙酮处理); 3. 粗酶液; 4. 纯化酶液 (镍柱纯化); 5. 甲醇诱导上清液

Note: M. Protein Marker; 1. Methanol-induced supernatant (treated with TCA and acetone); 2. Supernatant without methanol-induction (treated with TCA and acetone); 3. Crude enzyme solution; 4. Purified enzyme solution (Ni column purification); 5. Methanol-induced supernatant

图 3 诱导表达和纯化过程中重组脂肪酶的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE identification of recombinant lipase expression product during induction expression and purification

表 1 重组脂肪酶的活性变化
Table 1 Activity of recombinant lipaseCOA

样品	总体积/mL	酶活性/(U/mL)	总活性/U	蛋白质质量浓度/(mg/mL)	总蛋白/mg	比酶活/(U/mg)	纯化倍数	产率/%
甲醇诱导上清液	1 000	79.17	79 166.67	4.77	4 765.73	16.61	1	
硫酸铵沉淀后	60	526.67	31 600.00	25.01	1 500.40	21.06	1.27	39.92
透析后(粗酶液)	80	346.67	27 733.33	9.37	749.67	36.99	2.23	35.00
镍柱亲和层析后(纯化酶液)	20	173.33	3 466.67	1.15	23.08	150.21	9.04	4.38

注:蛋白质浓度测定采用 BCA 法

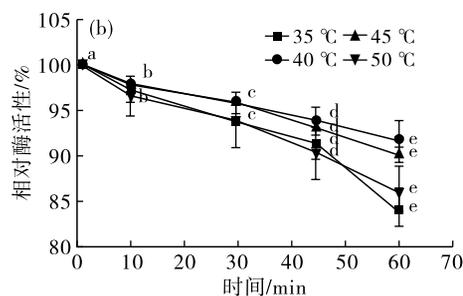
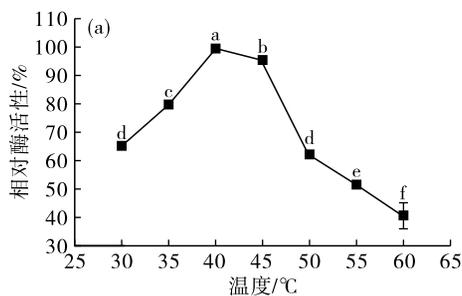
Note: The protein concentration was determined by BCA method

由图 3 可知,纯化后存在一条分子质量约为 33 kDa 的特征带,高于理论表达产物的分子质量 31.79 kDa,可能与重组脂肪酶的糖基化有关。由表 1 可知,重组脂肪酶的纯化倍数为 9.04 倍,产率为

4.38%,比酶活达到 150.21 U/mg。

2.4 重组脂肪酶蛋白的酶学性质

按照 1.2.7 方法考察温度和 pH 对重组脂肪酶活性及稳定性的影响,结果分别见图 4 和图 5。



注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). The same below

图 4 温度对重组脂肪酶活性(a)和稳定性(b)的影响

Fig. 4 Effect of temperature on the activity (a) and stability (b) of recombinant lipase

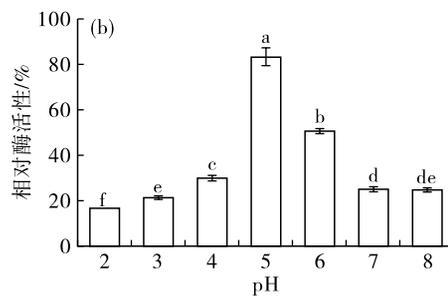
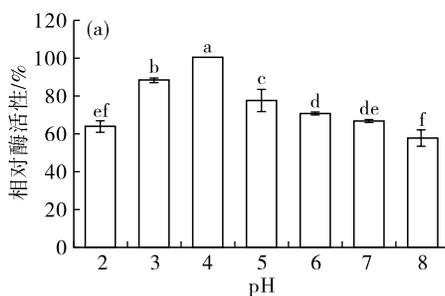


图 5 pH 对重组脂肪酶活性(a)和稳定性(b)的影响

Fig. 5 Effect of pH on the activity (a) and stability (b) of recombinant lipase

由图 4a 可见,该重组脂肪酶在 40°C 时活性最高,因此该酶的最适温度为 40°C。由图 4b 可知,在 35~50°C 范围内孵育 60 min 时,酶活性保持在 80% 以上,表明该重组脂肪酶具有良好的热稳定性,且在 40°C 时酶活性保持在 90% 以上,稳定性最佳。

由图 5a 可见,该重组脂肪酶在 pH 为 4 时活性最高,因此该酶的最适 pH 为 4.0,这表明该酶是一种酸性脂肪酶。由图 5b 可知,在 pH 为 5 时孵育 48 h,该重组脂肪酶活性保持在 80% 以上,表明该酶的 pH 稳定性较好。

该重组脂肪酶稳定性较强可能与其外部疏水结构密切相关,有研究表明,疏水性越强,其结构灵活性越好,可以有效地控制其相对构象稳定性^[15]。同时有研究也指出,添加组氨酸标签后,脂肪酶对热失活具有更高的抵抗力^[16]。另外,该重组脂肪酶所表现出的酶学性质可能与其五肽基序 RHSLG 有关。

2.5 重组菌产酶条件优化

2.5.1 单因素实验

按 1.2.5 方法,以 YNB 添加量 10 mL(100 mL BMMY 培养中)、接种量 4%、甲醇添加量 1%(每隔

24 h)、诱导培养时间 72 h 为固定条件,选择其中一个因素为变量进行单因素实验,考察其对重组脂肪

酶活性的影响,结果见图 6。

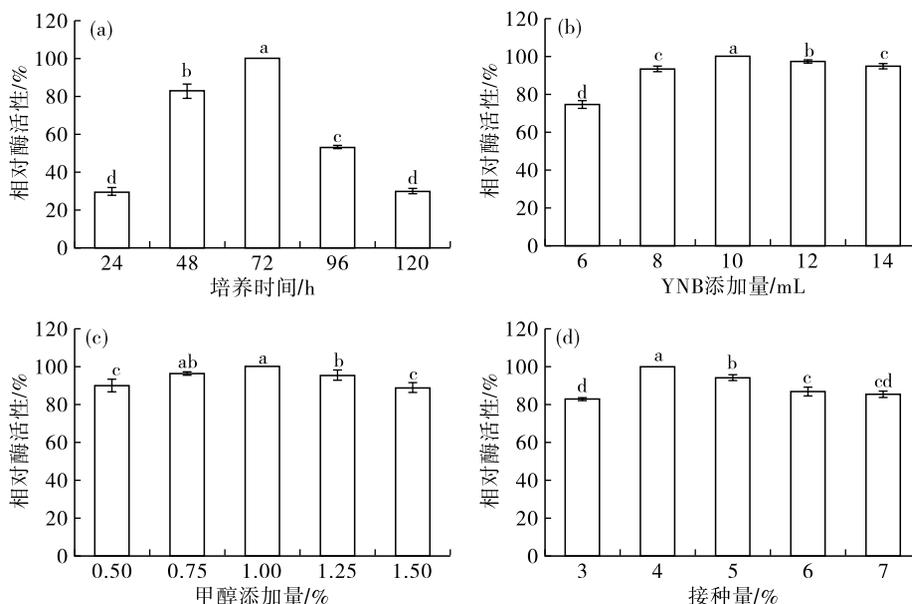


图 6 重组菌产酶单因素实验结果

Fig. 6 Results of the single factor experiment for enzyme production by the recombinant strain

由图 6a 可知,随着培养时间的延长,重组脂肪酶活性呈先升后降的趋势。酶活性降低可能是由于代谢产生的物质抑制了酶的产生。

YNB 是有效促进毕赤酵母 GS115 生长和抑制其他菌株生长的成分。由图 6b 可知,随着 YNB 添加量的增多,重组脂肪酶活性也呈先升后降的趋势。

甲醇作为酶生产的诱导剂,对酶活性有直接影响。由图 6c 可知,重组脂肪酶活性随着甲醇添加量的增加先升高后降低,当甲醇添加量为 1% 时达到最大。这是因为低浓度的甲醇可作为促进表达的诱导剂,但甲醇本身具有一定的毒性,浓度过大,会对细胞产生有害影响,进而抑制表达。另外,甲醇浓度过大,蛋白质逐渐展开并最终聚集,会导致蛋白酶失活^[17]。

由图 6d 可知,重组脂肪酶活性随着接种量的增加呈先升后降的趋势,在接种量为 4% 时达到最大。这是因为当接种量少时菌体量少,产酶量少,但当接种量过大时,菌体量过多,菌体间隙变小,所能利用的养分减少,氧气供应不足,导致产酶量降低。

2.5.2 响应面实验

在单因素实验的基础上,固定每隔 24 h 甲醇添加量为 1%,以培养时间(A)、YNB 添加量(B)、接种量(C)为因素,重组脂肪酶活性(Y)为响应值,利用 Design - Expert 软件的 Box - Behnken 模型设计三因素三水平的响应面实验,对产酶条件进行优化,响应面实验因素和水平见表 2,响应面实验设计及结果见表 3。

表 2 响应面实验因素和水平

Table 2 Factors and levels of response surface methodology

水平	A 培养时间/d	B YNB 添加量/mL	C 接种量/%
-1	2	8	3
0	3	10	4
1	4	12	5

表 3 响应面实验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface methodology

实验号	A	B	C	Y/(U/mL)
1	-1	1	0	62.4
2	0	0	0	78.5
3	-1	0	-1	54.8
4	0	0	0	78.7
5	0	-1	1	69.1
6	1	1	0	49.9
7	0	0	0	78.3
8	-1	-1	0	60.6
9	1	0	1	44.1
10	0	0	0	77.5
11	0	1	-1	66.5
12	1	-1	0	41.3
13	0	0	0	78.9
14	1	0	-1	39.9
15	0	-1	-1	61.8
16	-1	0	1	62.2
17	0	1	1	74.6

对表 3 数据进行拟合,得到多项回归方程: $Y = 78.38 - 8.10A + 2.57B + 3.38C + 1.70AB - 0.80AC + 0.20BC - 21.29A^2 - 3.54B^2 - 6.84C^2$ 。对回归方程进行方差分析,结果见表 4。

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	2 969.65	9	329.96	731.39	<0.000 1
A	524.88	1	524.88	1 163.45	<0.000 1
B	53.05	1	53.05	117.58	<0.000 1
C	91.13	1	91.13	201.99	<0.000 1
AB	11.56	1	11.56	25.62	0.001 5
AC	2.56	1	2.56	5.67	0.048 7
BC	0.16	1	0.16	0.35	0.570 2
A^2	1 908.48	1	1 908.48	4 230.32	<0.000 1
B^2	52.76	1	52.76	116.96	<0.000 1
C^2	196.99	1	196.99	436.65	<0.000 1
残差项	3.16	7	0.45		
失拟项	1.99	3	0.66	2.27	0.222 3
纯误差	1.17	4	0.29		
总和	2 972.81	16			

结果表明,该模型的决定系数(R^2)为 0.998 9,校正决定系数(R^2_{Adj})为 0.997 6,说明该模型的可信度与拟合程度都较为良好。由表 4 可知,模型达到极显著水平($p < 0.01$),失拟项的 p 值为 0.222 3,不显著,说明回归模型与真实值的拟合程度好。一次项对重组脂肪酶活性影响均极显著($p < 0.01$),且影响大小顺序为 $A > C > B$,交互项 AB 的影响极显著($p < 0.01$), AC 的影响显著($p < 0.05$), BC 的影响不显著($p > 0.05$),二次项影响均极显著($p < 0.01$)。

对模型求极大值,结果表明,当培养时间 2.82 d、YNB 添加量 10.67 mL、接种量 4.26% 时,重组脂肪酶活性最大,在此条件下理论预测值为 79.98 U/mL。为方便实际操作,将上述工艺条件调整为培养时间 2.8 d、YNB 添加量 10.50 mL、接种量 4.3%,在调整后的工艺条件下进行 3 次平行实验,所得重组脂肪酶的活性分别为 79.17、78.33、79.27 U/mL,平均值为 78.92 U/mL,与理论预测值相差较小,表明该模型有效。综上所述,该模型可用于毕赤酵母 GS115 - lipaseCOA 产脂肪酶体系的优化。另外,与优化前(YNB 添加量 10 mL、未添加甲醇诱导、接种量 4%)的重组脂肪酶活性(44.10 U/mL)相比,优化后重组脂肪酶的活性大幅提高。

3 结论

本研究采用 RT-PCR 方法从黑曲霉 C112 中克隆了脂肪酶基因 lipaseCOA,并对其进行了测序

(GenBank 登录号为 OP562898.1)。序列分析表明,该基因长度为 894 bp,包含一个非编码序列,编码 297 个氨基酸分子,分子质量为 31.79 kDa。氨基酸序列分析发现了一个新的五肽基序 RHSLG。运用基因工程技术构建了毕赤酵母重组菌(GS115 - lipaseCOA),脂肪酶基因 lipaseCOA 在毕赤酵母 GS115 中成功表达。该重组脂肪酶的最适反应温度为 40℃,在 35 ~ 50℃ 的范围内稳定,最适反应 pH 为 4.0,最佳保存 pH 为 5.0。通过单因素实验和响应面实验确定重组菌产酶的最优条件为培养时间 2.8 d、YNB 添加量 10.50 mL(100 mL BMMY 培养基中)、接种量 4.3%、每隔 24 h 甲醇添加量 1%,在此条件下重组脂肪酶活性为 78.92 U/mL,是优化前重组脂肪酶活性的 1.79 倍。可见,经本实验克隆、异源表达优化的脂肪酶稳定性强、酶活性高,可为脂肪酶工业化改造及应用提供理论指导与实践参考。

参考文献:

- [1] FATIMA S, FARYAD A, ATAA A, et al. Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(3): 445 - 458.
- [2] LATIP W, RAJA ABD RAHMAN R N Z, LEOW A T C, et al. The effect of N - terminal domain removal towards the biochemical and structural features of a thermotolerant lipase from an Antarctic *Pseudomonas* sp. strain AMS3 [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 560 [2024 - 10 - 29]. <https://doi.org/10.3390/ijms19020560>.
- [3] REYES - REYES A L, BARRANCO F V, SANDOVAL G. Recent advances in lipases and their applications in the food and nutraceutical industry [J/OL]. *Catalysts*, 2022, 12(9): 12090960 [2024 - 10 - 29]. <https://doi.org/10.3390/catal12090960>.
- [4] JIANG S, FAN Q, ZHANG Z, et al. Biodegradation of oil by a newly isolated strain *Acinetobacter junii* WCO - 9 and its comparative pan - genome analysis [J/OL]. *Microorganisms*, 2023, 11(2): 407 [2024 - 10 - 29]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020407>.
- [5] CÔTÉ A, SHARECK F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2008, 42(5): 381 - 388.
- [6] KASHYAP A, GUPTA R. Disrupting putative N - glycosylation site N17 in lipase Lip11 of *Yarrowia lipolytica* yielded a catalytically efficient and thermostable variant accompanying conformational changes [J/OL]. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 151: 109922 [2024 - 10 - 29]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109922>.

- [7] GUTIÉRREZ – DOMÍNGUEZ D E, CHÍ – MANZANERO B, RODRÍGUEZ – ARGÜELLO M M, et al. Identification of a novel lipase with AHSMG pentapeptide in hypocreales and *Glomerellales filamentous* fungi[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9367[2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.3390/ijms23169367>.
- [8] GUO C, ZHENG R, CAI R, et al. Characterization of two unique cold – active lipases derived from a novel deep – sea cold seep bacterium [J/OL]. *Microorganisms*, 2021, 9(4): 802[2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040802>.
- [9] MAGENGELELE M, HLALUKANA N, MALGAS S, et al. Production and *in vitro* evaluation of prebiotic manno – oligosaccharides prepared with a recombinant *Aspergillus niger* endo – mannanase, Man26A[J/OL]. *Enzyme Microb Technol*, 2021, 150: 109893[2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109893>.
- [10] YIN C, WANG B, HE P, et al. Genomic analysis of the aconidial and high – performance protein producer, industrially relevant *Aspergillus niger* SH2 strain [J]. *Gene*, 2014, 541(2): 107 – 114.
- [11] HOLMQUIST M. *Alpha/beta* – hydrolase fold enzymes: Structures, functions and mechanisms[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2000, 1(2): 209 – 235.
- [12] VERMA S, KUMAR R, MEGHWANSHI G K. Identification of new members of alkaliphilic lipases in archaea and metagenome database using reconstruction of ancestral sequences [J/OL]. *3 Biotech*, 2019, 9(5): 165[2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1693-9>.
- [13] HOSSEINI M, KARKHANE A A, YAKHCHALI B, et al. In silico and experimental characterization of chimeric *Bacillus thermocatenuatus* lipase with the complete conserved pentapeptide of *Candida rugosa* lipase [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169(3): 773 – 785.
- [14] 邢书奇. 黑曲霉 GZUF36 脂肪酶的结构与功能研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- [15] XING S, ZHU R, CHENG K, et al. Gene expression, biochemical characterization of a Sn – 1, 3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36 and its model – structure analysis [J/OL]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 633489 [2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.633489>.
- [16] FLORES S S, CLOP P D, BARRA J L, et al. His – tag β – galactosidase supramolecular performance [J/OL]. *Biophys Chem*, 2022, 281: 106739 [2024 – 10 – 29]. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106739>.
- [17] SANTAMBROGIO C, SASSO F, NATALELLO A, et al. Effects of methanol on a methanol – tolerant bacterial lipase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(19): 8609 – 8618.
-
- (上接第 72 页)
- [9] LORINI A, ARANHA B C, ANTUNES B D F, et al. Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times [J/OL]. *Food Chem*, 2021, 345:128758 [2024 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128758>.
- [10] MARTÍN – GARCÍA B, VERARDO V, LEÓN L, et al. GC – QTOF – MS as valuable tool to evaluate the influence of cultivar and sample time on olive leaves triterpenic components [J]. *Food Res Int*, 2019, 115:219 – 226.
- [11] 边雷. 油橄榄叶化学成分的研究 [D]. 兰州: 兰州交通大学, 2023.
- [12] ZHANG Y, WEN M, ZHOU P, et al. Analysis of chemical composition in Chinese olive leaf tea by UHPLC – DAD – Q – TOF – MS/MS and GC – MS and its lipid – lowering effects on the obese mice induced by high – fat diet [J/OL]. *Food Res Int*, 2020, 128:108785 [2024 – 05 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108785>.
- [13] HAMMOUDA I B, MÁRQUEZ – RUIZ G, HOLGADO F, et al. RP – UHPLC – DAD – QTOF – MS as a powerful tool of oleuropein and ligstroside characterization in olive – leaf extract and their contribution to the improved performance of refined olive – pomace oil during heating [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(43):12039 – 12047.
- [14] TAAMALLI A, ARRÁEZ – ROMÁN D, IBAÑEZ E, et al. Optimization of microwave – assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC – ESI – TOF – MS/IT – MS(2) [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(3):791 – 798.
- [15] YANG M, SUN J H, LU Z Q, et al. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2045 – 2062.
- [16] 王碧霞, 杜小奇, 邓燕, 等. 凉山油橄榄主栽品种叶中营养物质和酚类含量的季节性变化 [J]. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 2022, 46(4): 169 – 176.
- [17] 刘强, 孙云, 侯帅, 等. 橄榄多酚成分鉴定及生物活性的研究进展 [J]. *中国粮油学报*, 2024, 39(9): 213 – 223.