

解脂耶氏酵母脂肪酶 LIP4 和 LIP5 在毕赤酵母中的异源表达及酶学性质

赵鹤云, 肖潇, 徐莉, 刘云, 闫云君*

分子生物物理教育部重点实验室, 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 【目的】克隆解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的 cDNA 序列, 研究其基因结构, 并实现其在毕赤酵母中的功能表达, 以探讨其酶学性质。【方法】利用反转录 PCR 首次扩增 LIP4 和 LIP5 的编码基因, 用 SignalP 3.0 分析其基因序列, 然后分别构建胞内表达载体 pPIC3.5K-Lip4、pPIC3.5K-Lip5 和胞外表达载体 pPIC9K-Lip4、pPIC9K-Lip5, 将其转入毕赤酵母 GS115 中表达, 以 NTA 树脂纯化酶蛋白, 研究其酶学性质。【结果】cDNA 序列测序结果显示两者均不含内含子, 酶蛋白的氨基酸序列中含有典型脂肪酶的活性三联体结构和五肽保守区; 酶学性质研究表明, 两者的最适底物均为癸酸 (C8) 对硝基苯酚酯, 最适 pH 为 7.0, 最适温度为 40℃, 但 LIP4 对 pH 和温度更敏感; 两者均能被 Ca^{2+} 激活, 且 LIP5 还能为 Mg^{2+} 激活, 但均被 Hg^{2+} 、乙二胺四乙酸 (EDTA) 和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 强烈抑制。【结论】首次克隆了解脂耶氏酵母脂肪酶 LIP4 和 LIP5 编码基因, 实现了其在毕赤酵母中的活性表达, 并初步研究了其酶学性质, 为上述脂肪酶的应用及进一步深入研究解脂耶氏酵母脂肪酶家族奠定了基础。

关键词: 解脂耶氏酵母, 脂肪酶 4, 脂肪酶 5, 酶学性质, 脂肪酶家族

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)10-1374-08

解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 是非常规酵母中具有代表性的一种^[1], 自 20 世纪 60 年代开始应用于工业生产以来, 已逐步扩展到广泛工业领域, 且具有较大的医药应用潜力^[2]。虽然上世纪 90 年代解脂耶氏酵母被开发为一个新的酵母表达系统并成功表达了不同来源的蛋白^[3], 且它的应用也越来越广泛, 但其基础研究仍然较为薄弱。我国对此酵母的报道则更少, 仅限于生物柴油合成^[4]、废水处理^[5]等应用方面。

解脂耶氏酵母脂肪酶基因家族的特异性是其众多独特性质之一。据报道, 解脂耶氏酵母脂肪酶基因

家族迄今为止有 8 个成员, 目前仅对脂肪酶 LIP2^[6]、LIP7 和 LIP8^[7] 有较多报道, 并对它们各自不同的性质做了一些探索性研究。利用 LIP2 作为模式蛋白研究了解脂耶氏酵母糖基化类型及程度^[8]、信号肽切除机制^[6], 以及其手性拆分^[9-10]、生物转化^[4]、废物处理^[5]等方面的应用; 而其它脂肪酶则鲜有报道。LIP2 在对 2-溴代苯乙酸酯类 (可用于前列腺素、青霉素及噻唑等合成) 物质的手性拆分能力较强, 拆分 2-溴代邻甲基苯乙酸酯 (用于合成止痛药及非太累血管紧张素 II 受体拮抗剂的前体) 的 E 值 = 250, 是现有唯一能拆分此手型物质的 *Burkholderia cepacia* 脂肪

基金项目: 国家“863 计划” (2009AA03Z232, 2010AA101501); 教育部新世纪优秀人才基金 (NCET-07-0336)

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

作者简介: 赵鹤云 (1983 -), 女, 河南驻马店人, 博士研究生, 主要从事分子生物学与生物化学研究。E-mail: xiaohehc@gmail.com

收稿日期: 2011-04-15; 修回日期: 2011-06-07

QIAexpression™ 操作手册。

1.6 蛋白质电泳

SDS-PAGE 电泳参考文献 [16]。低分子量标准蛋白购于 Fermentas 公司。将诱导表达液离心,收集上清,流经 Ni-NTA 层析柱,先用 NTA-0 洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、pH 7.0) 洗去未特异结合于柱上的杂蛋白,随后以 NTA-30 洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、pH 7.0、30 mmol/L 咪唑) 再次清洗,最后用 NTA-200 洗脱液 (20 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl、pH 7.0、200 mmol/L 咪唑) 将与 His₆ 特异结合的目的蛋白洗脱下来,将 NTA-200 洗脱液用 NTA-0 溶液透析,经超滤浓缩至 0.5 mL。

1.7 蛋白质浓度的测定

蛋白质浓度测定参考文献 [17],以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.8 酶活力测定

酶活力测定采用分光光度法^[18],将含 10 mmol/L pNP 酯的乙腈溶液、无水乙醇和 50 mmol/L Tris-盐酸 (pH 8.0) 缓冲液,按照 1:4:95 的体积比配制成底物溶液,3 mL 底物溶液中加入 100 μL 酶液 40℃ 反应 10 min,于 410 nm 测定 OD。1 个酶活单位定义为每分钟释放 1 μmol 对硝基苯酚 (pNP) 所需的酶量。

1.9 酶学性质研究

1.9.1 底物链长特异性: 配制 10 mmol/L 含不同碳链长度羧酸的对硝基苯酚 (C2、C4、C6、C8、C10、C12、C14、C16、C18) 乙腈溶液,然后加入 4 倍体积的无水乙醇和 95 倍体积的 pH 8.0 Tris-盐酸缓冲液作为底物溶液,加入酶液 40℃ 反应 10 min,测定 OD₄₁₀。根据不同底物的水解酶活确定酶的链长特异性。随后的酶学性质均用最适碳链长度底物测定。

1.9.2 最适温度及最适 pH: 通过测定不同温度 (20℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃) 下的酶活力,以确定酶的最适催化温度,每个温度 3 个重复,取均值。通过测定不同 pH 范围 (3.0 - 11.0) 下的酶活力,以确定酶的最适反应 pH,所用 pH 缓冲液为: pH3.0 - 6.0 为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, pH6.0 - pH8.0 为 Tris-盐酸缓冲液, pH8.0 - pH10.0 为甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH10.0 - pH11.0 为磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液。

每个 pH 值测 3 次酶活,取均值。

1.9.3 温度稳定性及 pH 稳定性: 将酶液置于最适 pH 溶液中,在不同温度下放置 2 h,然后直接加入到“1.8”所述的底物溶液中,40℃ 下反应 10 min,测定其酶活力,以考察其温度稳定性;将酶液置于不同的 pH 溶液中,在最适温度下放置 2 h,加入上述底物溶液中,40℃ 下反应 10 min,测定其酶活力,以确定 pH 稳定性。

1.9.4 金属离子和抑制剂对酶活力的影响: 在最适温度和最适 pH 下,向酶液中分别加入 1 mmol/L 不同金属离子 (Ca²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Hg²⁺、Mg²⁺、Ni²⁺、Co²⁺) 或抑制剂乙二胺四乙酸 (EDTA)、二巯苏糖醇 (DTT)、苯甲基磺酰氟 (PMSF),处理 1 h。然后测定其酶活力,以确定不同金属离子和抑制剂对酶活力的影响。

2 结果

2.1 脂肪酶全长基因 Lip4 和 Lip5 的克隆及信号肽的预测

分别以解脂耶氏酵母基因组 DNA 和 cDNA 为模板,以 lip4 - 5'/lip4 - 3' 或 lip5 - 5'/lip5 - 3' 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物经测序与序列比对表明,两个基因中均无内含子,其全长分别为 1221 bp 和 1113 bp,对应编码 406 个和 370 个氨基酸。与 NCBI 上的序列比对无碱基突变。在其氨基酸序列中均含有丝氨酸水解酶的保守五肽 Gly-His-Ser-Leu-Gly 序列和催化三联体结构,两者的催化三联体分别为 LIP4: Ser₂₂₈-Asp₂₉₃-His₃₅₃; LIP5: Ser₂₃₃-Asp₃₀₁-His₃₆₀。经 SWISS-MODEL 建模发现两者与典型脂肪酶结构相似,推测两者有脂肪酶活性,故将其克隆入毕赤酵母表达载体中,纯化得到单一蛋白后,对其酶学性质进行研究以验证上述推测。

两者与解脂耶氏酵母脂肪酶家族中其它成员在氨基酸序列水平上的同源性见表 1。由表 1 可知,脂肪酶 LIP4 与 LIP7 的同源性最高,达 50.8%,与脂肪酶 LIP8 的同源性也较高,达 48.5%,与脂肪酶 LIP1 的同源性最低,仅为 7.6%;而脂肪酶 LIP5 与脂肪酶 LIP2 的同源性最高,达 40.3%,与脂肪酶 LIP1 的同源性最低,仅为 4.1%。

经 SignalP3.0 预测 (参数选择: organism group: Eukaryotes; method: Neural networks、Hidden Markov

models; graphics: GIF; output format: standard) 发现, 两个酶蛋白可能均有信号肽, 脂肪酶 LIP4 有信号肽的可能性为 50%, 信号肽切割位点在第 25 个和第

26 个氨基酸之间; 脂肪酶 LIP5 有信号肽的可能性为 99.7%, 信号肽切割位点在第 23 个氨基酸和第 24 个氨基酸之间。

表 1 脂肪酶 LIP4 和脂肪酶 LIP5 与解脂耶氏酵母脂肪酶基因家族其它成员同源性的比较

Table 1 Identities between LIP4/LIP5 and other lipases of *Y. lipolytica*

| Protein | LIP1 | LIP3 | LIP2 | LIP4 | LIP5 | LIP7 | LIP8 |
|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| LIP4 | 7.6% | 11.4% | 34.9% | 100% | 33.8% | 50.8% | 48.5% |
| LIP5 | 4.1% | 8.1% | 40.3% | 33.8% | 100% | 36.3% | 39.7% |

LIP2, LIP7 and LIP8 protein sequences were already known (by cDNA sequences)^[6-7]. Protein sequences of LIP1 and LIP3 were predicted using their DNA sequences^[19].

2.2 表达质粒的构建及重组转化子的筛选、鉴定

四种表达载体 pPIC3.5K-Lip4、pPIC9K-Lip4、pPIC3.5K-Lip5 和 pPIC9K-Lip5 的双酶切均有一条 1-1.5 kb 的条带, 与脂肪酶基因大小相一致, 表明表达载体构建是成功的, 且表达载体的测序结果也进一步证实载体构建的正确性。

四种表达载体通过电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞后, 涂布到 MD 平板上, 利用组氨酸缺陷型进行筛选。随机挑选 MD 平板上的克隆子, 抽提其基因组 DNA, 分别以 lip4-5'/lip4-3' 和 lip5-5'/lip5-3' 为引物, 经 PCR 扩增出目的片段大小的转化子为阳性转化子。根据所用载体及所表达的基因, 将所表达的蛋白质分别命名为 3.5K-LIP4、9K-LIP4、3.5K-LIP5 和 9K-LIP5。

2.3 脂肪酶基因在毕赤酵母 GS115 中的表达及纯化

将分泌型转化子 (GS115-9K-LIP4 和 GS115-9K-LIP5) 挑至含罗丹明 B 和橄榄油的平板上, 每隔 12 h 添加 0.5 mL 甲醇进行诱导。观察平板上水解圈大小, 挑选水解圈大、出现时间早的转化子进行摇瓶诱导发酵。将 2 L 诱导表达液离心, 收集上清, 经纯化和透析, 超浓缩后, 得到 0.5 mL 纯化液。两种胞内表达型转化子 GS115-3.5K-LIP4 和 GS115-3.5K-LIP5 的发酵细胞经高压细胞破碎仪 (20 kpi) 破碎后, 离心收集上清进行纯化、透析及超浓缩, 操作与胞外表达型转化子相同。将 4 种工程菌的纯化样品进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 1。图 1 中显示, 两种胞内表达型转化子 GS115-3.5K-LIP4 和 GS115-3.5K-LIP5 的发酵上清均未纯化出目的蛋白, 而两种分泌型转化子 GS115-9K-LIP4 和 GS115-9K-LIP5 的发酵液均纯化得到了目的蛋白, 其大小分别约为 50 kDa 和 45 kDa。

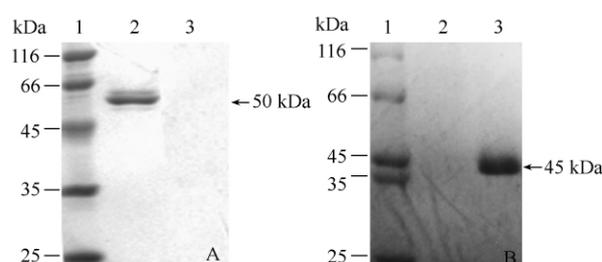


图 1 纯化后脂肪酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified lipases. A: 1. Protein marker; 2. Purification of 9K-LIP4 by His-Bind; 3. Purification of 3.5K-LIP4 by His-Bind. B: 1. Protein marker; 2. Purification of 3.5K-LIP5 by His-Bind; 3. Purification of 9K-LIP5 by His-Bind.

2.4 酶学性质的测定

分别用含不同碳链长度的对硝基苯酚酯为底物, 检测了脂肪酶 9K-LIP4 和 9K-LIP5 的活力, 结果见图 2。结果显示, 两种脂肪酶均对辛酸 (C8) 对硝基苯酚酯表现出最高水解活力, 对癸酸 (C10) 对硝基苯酚酯的水解活性也较高, 且两者均偏好水解中短链对硝基苯酚酯 (C4-C10)。其最适底物均为中链脂肪酸酯, 而对 C14 以上的底物水解活性很低。

脂肪酶 9K-LIP4 和 9K-LIP5 的最适 pH 和最适温度见图 3-A。由图 3-A 可知, 两者在 pH 7.0 活力最高, 分别达 7.6 U/mg 和 4.4 U/mg, 但在 pH 低于 5.0 和高于 9.0 时, 活力均迅速下降。图 3B 是在 pH 7.0 下测定的两者最适温度情况。可见, 两者均在 40°C 时活力最高, 分别达 10.2 U/mg 和 5.1 U/mg; 且在 30-50°C 之间均保持较高活力 (>3.0 U/mg)。脂肪酶 9K-LIP4 和 9K-LIP5 的 pH 和温度稳定性见图 4。由图 4-A 可知, 脂肪酶 9K-LIP4 和 9K-LIP5 在 pH 6.0-8.0 时均能保持 60% 以上的活力, 脂肪酶 9K-LIP4 对环境 pH 的变化比 9K-LIP5 似乎更敏感些。由图 4-B 可见, 在 35-45°C 范围内, 两者均保持 60% 以上的活力。

据文献报道,二价金属离子对多种脂肪酶均有促进或抑制效应^[20-21]。因此,本文检测了多种二价金属离子对解脂耶氏酵母脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的影响,结果见图 5。由图 5 可知,脂肪酶 9K-LIP4 和 9K-LIP5 均能被 1mmol/L 的 Ca²⁺ 激活,其中 Ca²⁺ 对 9K-LIP4 的促进效果更加明显,使其相对活力提高 53%,但对 9K-LIP5 的激活作用有限,仅能将其相对活力提高 25%;而 Mg²⁺ 对这两种脂肪酶的影响效果恰恰相反,9K-LIP5 在 1 mmol/L 的 Mg²⁺ 溶液中相对活力达到了 145%,而 9K-LIP4 的相对活力却略微有下降,为 89%;Cu²⁺、Ni²⁺ 对两种酶均表现出抑制作用,但对酶 9K-LIP4 的抑制作用比酶 9K-LIP5 的抑制作用更强些;Hg²⁺ 对两种脂肪酶均有很强的抑制作用,作用 1 h 后其残余酶活均低于 20%。此外,还考察了抑制剂对两种重组脂肪酶的影响。在选用的 3 种抑制剂中,EDTA 对酶活力影响最小,基本可以忽略;但 PMSF 和 DTT 对两者的抑制作用非常明显。经 DTT 处理后,9K-LIP4 的残余酶活下降为 33%,9K-LIP5 的残余酶活仅为初始的 18%,这可能与 DTT 拥有较强的还原力有关,DTT 处理后能将脂肪酶的二硫键还原成巯基,而二硫键对脂肪酶三维结构的稳定和维持发挥着重要作用,二硫键的破坏可导致脂肪酶活力明显降低。PMSF 为丝氨酸蛋白酶抑制剂,结果显示,它能导致两种脂肪酶活力全部丧失。原因是 PMSF 通过与蛋白酶活性中心的丝氨酸残基结合,并使其磺酰化而起到抑制作用,而脂肪酶是一类丝氨酸水解酶,因此 PMSF 能导致其酶活完全丧失。

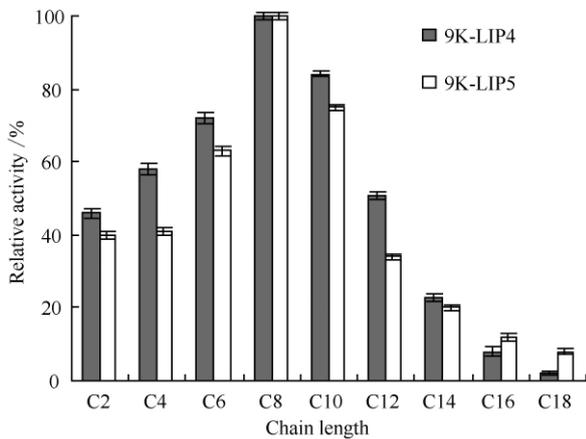


图 2 脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的底物特异性
Fig. 2 Chain length specificity of LIP4 and LIP5 on pNPs.

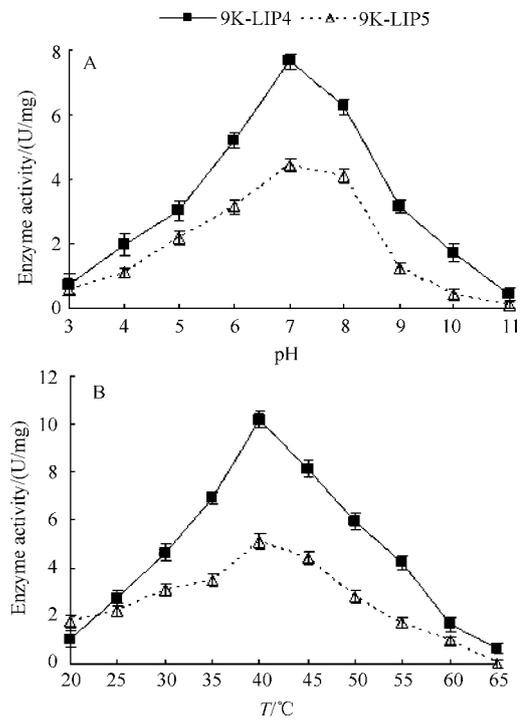


图 3 脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的最适 pH 及最适温度
Fig. 3 The optimal pH and temperature of LIP4 and LIP5.

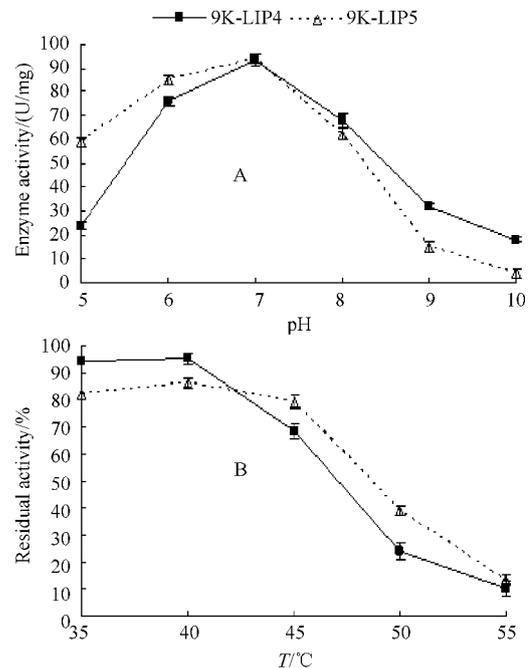


图 4 脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的 pH 及温度稳定性
Fig. 4 The pH and temperature stability of LIP4 and LIP5.

3 讨论

解脂耶氏酵母是具有很高研究价值的非常规酵母, 随着其表达系统的成功构建及不断应用, 其基础研究也越来越受到重视。解脂耶氏酵母脂肪酶基因家族不同于诸多酵母的脂肪酶基因家族, 成员之间

同源性低, 性质差异大, 这从目前已报道的脂肪酶 LIP2、LIP7 和 LIP8 可见一般, 而对家族中其它脂肪酶基因的性质知之甚少。为此, 本研究克隆了解脂耶氏酵母脂肪酶基因 Lip4 和 Lip5, 并通过异源表达得到单一脂肪酶 LIP4 和 LIP5, 研究了其酶学性质, 这对系统分析、了解解脂耶氏酵母脂肪酶家族功能、代谢方式等均有积极意义。

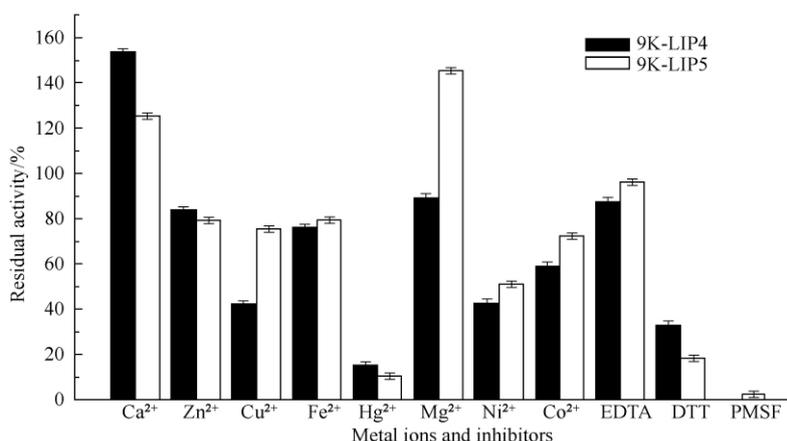


图 5 金属离子和抑制剂对脂肪酶活力的影响

Fig. 5 Effects of metal ions and inhibitors on enzyme activity.

本文采用反转录 PCR 首次得到了脂肪酶 LIP4 和 LIP5 的 cDNA 序列, 与以解脂耶氏酵母基因组 DNA 为模板克隆的脂肪酶 Lip4 和 Lip5 全长比对, 其没有内含子, 编码的酶蛋白氨基酸序列中有丝氨酸水解酶的保守五肽和催化三联体, 并经初步三维建模发现其与典型脂肪酶的结构相似, 将其表达, 经酶学性质测定, 证实两者均为脂肪酶。

利用毕赤酵母表达脂肪酶 LIP4 和 LIP5, 对其进行纯化后研究了 LIP4 和 LIP5 的酶学性质, 结果显示, LIP4 与 LIP5 的最适底物均为癸酸 (C8) 对硝基苯酚酯, 且更偏好于水解中短链对硝基苯酚酯; 最适 pH 为 7.0, 最适温度为 40℃, 脂肪酶 LIP4 对

pH 和温度要更敏感些。两者应均属常温中性脂肪酶。两者均能被 Ca²⁺ 激活, LIP5 还能为 Mg²⁺ 激活; 其活力均能被 Hg²⁺、PMSF、DTT 强烈抑制。但已报道解脂耶氏酵母脂肪酶 LIP2 最适底物是 C14, 最适温度 40℃, 最适 pH 为 8.0, 在 25℃ 时最稳定, 有机溶剂耐受性也较强, 常用去污剂对其活力的影响不大^[21]; 脂肪酶 LIP1 最适底物为 C4, 最适温度为 45℃, 最适 pH 为 8.5; 脂肪酶 LIP7 和 LIP8 的最适底物分别为 C6 和 C10, 最适温度分别为 40℃ 和 45℃, 最适 pH 均为 8.0^[7, 13]。由此可见, 解脂耶氏酵母脂肪酶家族成员在基本酶学性质上差异是显著的 (表 2)。

表 2 解脂耶氏酵母脂肪酶基因家族成员之间性质比较

Table 2 Comparison of properties of lipases from *Y. lipolytica*

| Lipases | Optimal pH | Optimal temperature/℃ | Chain length specificity | Activator | Inhibitors |
|---------|------------|-----------------------|--------------------------|---|--|
| LIP4 | 7 | 40 | C ₈ | Ca ²⁺ | Hg ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , PMSF, DTT |
| LIP5 | 7 | 40 | C ₈ | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ | Hg ²⁺ , Ni ²⁺ , PMSF, DTT |
| LIP1 | 8.5 | 45 | C ₄ | ND ^a | ND |
| LIP2 | 8 | 40 | C ₁₄ | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Tween 80, Span 65 | Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , SDS |
| LIP7 | 8 | 40 | C ₆ | ND | ND |
| LIP8 | 8 | 45 | C ₁₀ | ND | ND |

ND^a, not determined.

Fickers 等^[7] 曾将脂肪酶 LIP2、LIP7 和 LIP8 三个胞外脂肪酶基因同时敲除,发现此突变菌株仍能在以三油酸甘油酯或三丁酸甘油酯为唯一碳源的平板上缓慢生长,但检测不到胞外脂肪酶活性。本研究将 Lip4 和 Lip5 全长基因克隆至毕赤酵母胞内表达,在其发酵上清液中没有发现目的蛋白。可能的原因是:①预测的信号肽不是真正的信号肽,导致它们没有被分泌到胞外;②此信号肽在表达系统中不适用;③预测的信号肽是真正的信号肽,但不能将蛋白定位到胞外,而是将其定位在胞内某细胞器中。本实验结果结合之前 Pignede 等的研究工作提示,LIP4 和 LIP5 的信号肽很可能是将其定位在胞内某细胞器中发挥脂肪酶作用,后续研究将构建这两种脂肪酶的缺失突变株,以期解答上述问题。

参考文献

- [1] Gerold B , Claude G. *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf K , Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook. The Heidelberg: Springer-Verlag , 1996 , 313-388.
- [2] Fickers P , Benetti PH , Waché Y , Marty A , Mauersberger S , Smit MS , Nicaud JM. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica* , and its potential applications. *FEMS Yeast Research* , 2005 , 5: 527-543.
- [3] Catherine M , Claude G , Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal of Biotechnology* , 2004 , 109: 63-81.
- [4] Deng L , Tan TW , Wang F , Xu XB. Enzymatic production of fatty acid alkyl esters with a lipase preparation from *Candida sp.* 99-425. *European Journal of Lipid Science and Technology* , 2003 , 105: 727-734.
- [5] 吴兰 ,杨金平. 解脂耶氏酵母降解含油废水的研究. *江西能源 (Jiangxi Energy)* , 2003 , 4: 11-13.
- [6] Pignede G , Wang H , Fudalej F , Gaillardin C , Seman M , Nicaud JM. Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology* , 2000 , 182: 2802-2810.
- [7] Fickers P , Fudalej F , Dall MTL , Casaregola S , Gaillardin C , Thonart P , Nicaud JM. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology* , 2005 , 42: 264-274.
- [8] Pascale J , Florence B , Franck F , Miguel C , Vignaud C , Dossat V , Burghoffer C , Marty A , Chardot T , Nicaud JM. Analysis of *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase Lip2p glycosylation. *FEMS Yeast Research* , 2007 , 7(8) : 1317-1327.
- [9] Guieysse D , Salagnad C , Monsan P , Remaud-Simeon M. Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids. *Tetrahedron: Asymmetry* , 2003 , 14: 317-323.
- [10] Bordes F , Cambon E , Dossat-Létisse V , André I , Croux C , Nicaud JM , Marty A. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *Chembiochem* , 2009 , 10: 1705-1713.
- [11] 张黎 ,赵鹤云 ,徐莉 ,刘云 ,闫云君. 解脂耶氏酵母脂肪酶基因 lip1 的克隆、密码子优化及功能表达. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)* , 2010 , 50 (7) : 970-975.
- [12] Yu MR , Lange S , Richter S , Tan TW , Schmid RD. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Protein Expression and Purification* , 2007 , 53 (2) : 255-263.
- [13] Song HT , Jiang ZB , Ma LX. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS2.1216. *Protein Expression and Purification* , 2006 , 47 (2) : 393-397.
- [14] Sambrook J , Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002 , 359-361.
- [15] Bendtsen JD , Nielsen H , Heijne G , Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* , 2004 , 340: 783-795.
- [16] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 1970 , 227 (5259) : 680-685.
- [17] 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.
- [18] Lee SH , Choi JI , Park SJ , Lee SY , Park BC. Display of bacterial lipase on the *Escherichia coli* cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in enantioselective biocatalysis. *Applied Environmental Microbiology* , 2004 , 70 (9) : 5074-5080.
- [19] Dujon B , Sherman D , Fischer G. Genome evolution in yeasts. *Nature* . 2004 , 430 (6995) : 35-44.

- [20] 舒正玉, 杨江科, 闫云君. 黑曲霉 F044 脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2007, 1: 96-100.
- [21] Yu MR, Qin SW, Tan TW. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 384-391.

Heterologous expression and characterization of *Yarrowia lipolytica* lipase 4 and lipase 5 in *Pichia pastoris*

Heyun Zhao, Xiao Xiao, Li Xu, Yun Liu, Yunjun Yan*

Key Laboratory of Molecular Biophysics of the Ministry of Education, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: [Objective] To clone cDNA sequences of lipase 4 (LIP4) and lipase 5 (LIP5), analyze gene structures and express them in *Pichia pastoris* so as to investigate their enzymatic characteristics. [Methods] We first cloned cDNA sequences of LIP4 and LIP5 by reverse transcription PCR and analyzed their gene structures by SignalP 3.0. Then, intracellular expression vectors pPIC3.5K-Lip4, pPIC3.5K-Lip5 and inducible secretion vectors pPIC9K-Lip4, pPIC9K-Lip5 were constructed. All vectors were transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation, resulting in a series of engineered strains. After fermentation and NTA-Ni resin purification, the enzymatic properties of LIP4 and LIP5 were examined. [Results] The cloned cDNA sequences revealed that there was no intron in both of Lip4 and Lip5. The two lipases both contained catalytic triads and conserved GHSLG motifs. Their optimal substrate, pH, temperature were respectively pNP-caprylate (C8), 7.0 and 40°C. The activities of LIP4 and LIP5 were 10.16 U/mg and 5.1 U/mg, respectively. It was found that LIP4 was more sensitive to the variations of pH and temperature than LIP5. LIP4 and LIP5 could both be stimulated by Ca²⁺, besides LIP5 could also be activated by Mg²⁺. They were both strongly inhibited by Hg²⁺, Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and Dithiothreitol (DTT). [Conclusion] The cloning of Lip4 and Lip5, expression in *P. pastoris* and characterization of their properties would offer a solid basis for their large-scale production and future application. In addition, the results also enriched the data for a systematic research on the lipase gene family of *Y. lipolytica*.

Keywords: *Yarrowia lipolytica*, lipase 4, lipase 5, enzymatic characteristics, lipase gene family

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2009AA03Z232, 2010AA101501) and by the Program for New Century Excellent Talents in University (NCET-07-0336)

* Corresponding author. Tel: +86-27-87792214; Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@tom.com

Received: 15 April 2011 / Revised: 7 June 2011