

产碱假单胞菌脂肪酶的克隆表达及酶学性质研究

孙苗苗 陈辉 吴坚平 杨立荣*

(浙江大学 化学工程与生物工程学系 浙江 杭州 310027)

摘要: 【目的】克隆产碱假单胞菌的脂肪酶基因, 实现其在大肠杆菌中异源表达并进行酶学性质研究。【方法】通过基因文库构建和 PCR, 获得脂肪酶基因, 并以 pET30a(+) 为表达载体、*E. coli* BL21(DE3) 为宿主菌, 在大肠杆菌中进行异源表达, 表达产物经 HisTrap™ 亲和层析柱纯化后进行酶学性质研究。【结果】从产碱假单胞菌中克隆得到一个脂肪酶基因, 大小为 1 575 bp (GenBank 登录号为 JN674069)。该酶分子量为 55 kD, 最适底物为 *p*-NPO, 最适反应温度和 pH 分别为 35 °C、pH 9.0。重组酶经 1 mmol/L 的 Cu²⁺ 处理 30 min 可使酶活提高至 156%。在最适反应条件下重组酶的比活力为 275 U/mg, K_m 和 V_{max} 分别为 80 μmol/L 和 290 mmol/(min·g protein)。【结论】产碱假单胞菌脂肪酶基因的克隆与表达不仅积累了脂肪酶基因的资源, 并为其在手性拆分中的应用奠定基础。

关键词: 产碱假单胞菌, 脂肪酶, 克隆, 表达

Cloning, expression and characterization of lipase from *Pseudomonas alcaligenes*

SUN Miao-Miao CHEN Hui WU Jian-Ping YANG Li-Rong*

(Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University,
Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: [Objective] The lipase gene of *P. alcaligenes* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, the enzymatic properties were characterized. [Methods] The lipase gene was

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20936022); 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 国家 863 计划项目(No. 2011AA02A209)

*通讯作者: Tel: 86-571-87952363; 信箱: lryang@zju.edu.cn

收稿日期: 2012-02-13; 接受日期: 2012-04-20

obtained by constructing the genomic library of *P. alcaligenes* and PCR. Then the gene over-expressed in *E. coli* BL21(DE3) with plasmid pET30a(+). The recombinant lipase was purified with HisTrapTM affinity chromatography and the enzymatic properties were determined. [Results] A 1 575 bp lipase gene was attained (GenBank accession number: JN674069). The molecular weight of lipase was 55 kD, the optimal substrate of the lipase was *p*-NPO, the optimal temperature and pH were 35 °C and pH 9.0. The lipase activity was increased to 156% after treated by 1 mmol/L Cu²⁺ for 30 min. Under the optimum conditions, the specific activity, K_m and V_{max} of the enzyme were 275 U/mg, 80 μ mol/L and 290 mmol/(min·g protein), respectively. [Conclusion] The cloning and expressing of lipase provided the fundamental to the application in chiral resolution.

Keywords: *Pseudomonas alcaligenes*, Lipase, Cloning, Expression

脂肪酶(EC3.1.1.1)是分解三脂酰甘油水解酶类,属于 α/β 折叠水解酶超家族,一般包含活性位点模序为G-[HYWV]-S-x-G, Ser为活性位点,并与 His 和 Asp 构成典型的活性部位。目前对假单胞菌脂肪酶归类于 Family I、Family II、Family IV、Family V、Family VIII^[1],主要集中在 Family I 中,Jaeger^[2]根据其氨基酸序列的同源性分为 I.1、I.2 和 I.3。假单胞菌脂肪酶由于其具有高立体选择性、底物专一性以及区域选择性因而被广泛应用于食品加工、药物合成和手性拆分,如产碱假单胞菌脂肪酶用于水解,荧光假单胞菌脂肪酶用于有机合成,门多萨假单胞菌的脂肪酶用于洗涤剂添加剂^[3]。目前对消旋体药物的生物手性拆分已经成为研究的热点,如 DL-薄荷醇生物不对称拆分,已报道有洋葱假单胞菌脂肪酶 (Lipase-PS)^[4]、荧光假单胞菌脂肪酶 Amano AK^[5]等。其优点在于反应条件温和、少有副反应、能耗低且应用潜力大。

目前关于产碱假单胞菌脂肪酶/酯酶的基因序列在 NCBI 中报道大约 19 种,但酶之间的氨基酸序列同源性较低,进行酶学性质和功能鉴定的研究也鲜见报道。实验室保藏的野生菌种产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes* X1)具备不对称

水解 DL-薄荷酯混合物中的 L-薄荷酯能力,该菌种分泌多种脂肪酶,为获得具备专一性拆分制备 L-薄荷醇的脂肪酶及其基因序列,本文构建野生菌产碱假单胞菌的基因文库,通过功能筛选,成功得到该脂肪酶基因(*pal*),并实现其在大肠杆菌中的高效表达。通过表达条件的优化和酶的纯化,考察脂肪酶(PAL)的酶学性质,以及通过同源分析构建进化树和酶结构分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 宿主 *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21(DE3), 载体 pUC19、pET30a(+)为本实验保存,产碱假单胞菌由实验室筛选获得。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*Sau*3A I、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP), T4 DNA 连接酶, *Taq* DNA 聚合酶, DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒购自 Axygen; 4-硝基苯酚(*p*-NP), 4-硝基苯乙酸酯(*p*-NPA, C₂), 4-硝基苯丁酸酯(*p*-NPB, C₄), 4-硝基苯辛酸酯(*p*-NPO, C₈), 4-硝基苯月桂酸酯(*p*-NPL, C₁₂), 4-硝基苯棕榈酸酯(*p*-NPP, C₁₆)均购自 Sigma 公司。

1.1.3 筛选培养基(g/L): 酵母提取物 5.00, 胰化蛋白胨 20.00, $MgSO_4$ 0.60, $MgCl_2$ 0.45, 于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min。接种前加入终浓度为 0.1 g/L 氨苄青霉素, 0.5 mmol/L IPTG, 0.001% 罗丹明以及 0.3% 的三丁酸甘油酯乳化液, 摇匀倒平板。

1.2 基因文库构建

提取产碱假单胞菌基因组 DNA, 用 *Sau3A* I 进行部分酶切后, 琼脂糖凝胶电泳回收 2–10 kb 的 DNA 片段。采用质粒抽提试剂盒提取质粒 pUC19, 用 *Bam*H I 酶切后用去磷酸化酶(CIAP)处理。回收的基因片段与处理后的载体经 T4 DNA 连接酶连接并转化超级感受态 *E. coli* DH5 α , 涂布筛选培养基, 构建基因文库。

1.3 阳性克隆子筛选

挑取有水解圈的阳性克隆子(pUC19-*pal* 质粒)至含有氨苄青霉素(0.1 g/L)的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD_{600} 达到 0.6 时加入 IPTG 诱导 6 h, 离心细胞破碎后取上清拆分 DL-薄荷丙酸酯, 将有拆分活力的阳性克隆子提取质粒进行测序。

1.4 序列分析

脂肪酶基因 *pal* 的蛋白质分子量及等电点预测采用 Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/), 氨基酸一致性分析采用 PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 信号肽序列预测采用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 进化树分析使用 MEGA 4.1 软件, ClustalX 1.83 分析其同源性。

1.5 目标基因 *pal* 的克隆

根据测序结果分析开放阅读框, 设计引物: F: 5'-CCGGAATTCGTTTCTTACATGTTGCTCA GCA-3', R: 5'-CGCCTCGAGTGCATTCATTCAG AAAGTCCA-3'下划线分别为 *Eco*R I, *Xho* I 酶切位点, 以 pUC19-*pal* 为模板, 通过 PCR 扩增成熟脂肪酶序列。PCR 条件为: 94 °C 2 min; 94 °C

30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 3 min, 共 30 个循环; 72 °C 2 min。利用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切该片段, 克隆至经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切的 pET30a(+)后, 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3)。挑选阳性克隆子, 提取质粒进行序列测定。

1.6 重组 PAL 的诱导表达

将重组菌 *E. coli* BL21(DE3)/pET30a(+)-*pal* 接种至 50 mL 含有卡那霉素(50 g/L)的 LB 培养基中, 37 °C 培养至 OD_{600} 达到 1.2, 加入终浓度为 0.3 mmol/L IPTG, 18 °C 诱导 10 h。

1.7 重组 PAL 的纯化

收集菌体, 用预冷的结合缓冲液 (50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 洗涤菌体后悬浮菌体, 置于冰浴进行超声波破碎, 4 °C, 12 000 \times g 离心 20 min, 获得含 His-tag-PAL 融合蛋白上清液。采用 HisTrapTMFF 亲和层析柱纯化, 纯化过程参照 GE healthcare 说明书。将得到的酶液用脱盐柱(HisTrap Desalting, GE)进行脱盐处理, 用于酶学性质研究。纯化蛋白通过 SDS-PAGE 电泳检测纯化效果。

1.8 重组 PAL 酶活力和蛋白质浓度的测定

1.8.1 对硝基苯酚法测 PAL 水解活力: 反应体系总体积为 4 mL, 反应液包含 1 mmol/L *p*-NPO, 50 mmol/L Gly-NaOH (pH 9.0)和乙醇, 即 *p*-NPO: 乙醇:Gly-NaOH=1:4:95 (V/V/V)。反应液经 35 °C 预热后, 加入适当酶液, 反应 3 min, 检测 *p*-NP 的生成, 检测波长为 405 nm。酶活单位定义为: 每分钟分解 *p*-NPO 为 1 μ mol *p*-NP 所需的酶量。

1.8.2 PAL 对 DL-薄荷丙酸酯拆分活力研究: 取诱导后细胞破碎上清 3 mL, 加入终浓度为 25 mmol/L 的 DL-薄荷酯的 DMSO 混合物, 35 °C 反应 12 h, 用正己烷 1:1 萃取, 气相检测其拆分活性。

1.8.3 考马斯亮蓝法(Bradford 法)测定蛋白浓度^[6]: 使用 Bio-Red 公司蛋白试剂盒, 以 BSA 为

标准蛋白, 测定在 595 nm 下的吸光值, 以 OD_{595} 为横坐标, 蛋白浓度为纵坐标, 绘制蛋白浓度标准曲线。

1.9 PAL 酶学性质研究以及反应动力学常数测定

1.9.1 PAL 最适反应温度及热稳定性: 在 10 °C–60 °C 之间测定酶活力, 以确定最适反应温度。初始酶液在不同温度中保温 30 min, 冰上冷却后采用 *p*-NPO 法测定酶活, 将处理 0 min 的酶活为对照, 设定为 100%。

1.9.2 PAL 最适 pH 及 pH 稳定性: 配置 pH 范围为 5.0–11.0 的缓冲液 (其中 pH 5.0–7.0 用 50 mmol/L 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液, pH 7.0–9.0 用 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液, pH 9.0–11.0 用 50 mmol/L 的 Gly-NaOH 缓冲液), 35 °C 测定酶活, 以酶活最高点的相对酶活力为 100%, 确定最适 pH。将酶置于上述缓冲液中, 4 °C 放置 20 h 后, 在 35 °C、50 mmol/L、pH 9.0 Gly-NaOH 的缓冲液中反应测定酶活, 以酶活力最高点的相对酶活力为 100%, 确定 pH 稳定性。

1.9.3 底物特性: 分别以不同链长的对硝基苯酚酯(C₂–C₁₆)为底物, 在标准体系中测定酶活力, 以最高酶活力为 100%。

1.9.4 脂肪酶界面激活测定^[7–8]: 采用橄榄油乳化滴定法, 通过不断增加橄榄油乳液浓度, 检测脂肪酶活性的变化。

1.9.5 金属离子以及其他试剂对酶的影响: 分别将终浓度为 1 mmol/L, 10 mmol/L 的金属离子和适当浓度 PAL 混匀后冰浴 30 min, 在 50 mmol/L, pH 9.0 Gly-NaOH 缓冲体系中测定酶活力, 处理前的酶活力为 100%。

1.9.6 反应动力学常数 K_m 测定: 底物 *p*-NPO 的浓度分别为 50、80、100、125 和 160 μmol/L 梯度设置, 测定 PAL 在不同底物浓度下的反应初速

度, 以确定酶的动力学常数。根据 Michaelis-Menten 方程, 通过双倒数作图法, 求出 K_m 值。

2 结果

2.1 基因文库构建以及序列分析

构建产碱假单胞菌基因文库, 经两轮筛选后获得一株具备拆分制备 L-薄荷醇的阳性克隆子, 包含 1 575 bp 的开放阅读框, 编码 524 个氨基酸, SignalP 预测结构表明 N 端含有 20 个氨基酸的 N 端信号肽序列。未切除信号肽的脂肪酶主要以无活性的包涵体形式存在, 切除信号肽序列后, 克隆到具有活性的成熟脂肪酶, 预测分子量为 55 kD 左右, 等电点为 6.69。该基因已提交 GenBank, 登录号为 JN674069。

将 PAL 与 NCBI 的 PSI-BLAST 分析, 结果表明 PAL 具有一个保守的脂肪酶功能域, 与寡养单胞菌 SKA14 脂肪酶有 90% 的相似性, 与来自野油菜黄单胞菌 85-10, 糖多孢红霉菌 NRRL2338 和加氏黄单胞菌 ATCC19865 分别有 57%, 55% 和 47% 的氨基酸序列一致性。进一步采用 ClustalX 1.83 软件分析氨基酸序列同源性, 如图 1 所示: PAL 具有典型的脂肪酶催化中心 Ser¹³³-Asp²⁴³-His²⁷¹, 其中 Ser 位于保守五肽 Gly¹³¹-Ile¹³²-Ser¹³³-Tyr¹³⁴-Gly¹³⁵ 中。此外预测 PAL 拥有 ATP 结合区域, 一般存在于采用 ABC 分泌机制菌种中^[9–10]。PAL 与已报道的产碱假单胞菌脂肪酶的氨基酸序列相似性很低, 为该种属脂肪酶的一种新酶。

根据氨基酸序列构建进化树, PAL 与脂肪酶家族 I 亲缘关系最近, 进一步与家族 I 中 7 个亚家族进化树分析, 结果显示 PAL 与 I.3 亚家族处于同一进化树上, 亲缘关系最近 (图 2)。已报道的 I.3 家族脂肪酶分子量一般大于 I.1 和 I.2 亚家族, 缺乏 N 端信号肽序列和半胱氨酸, 且无分子伴侣^[11]。

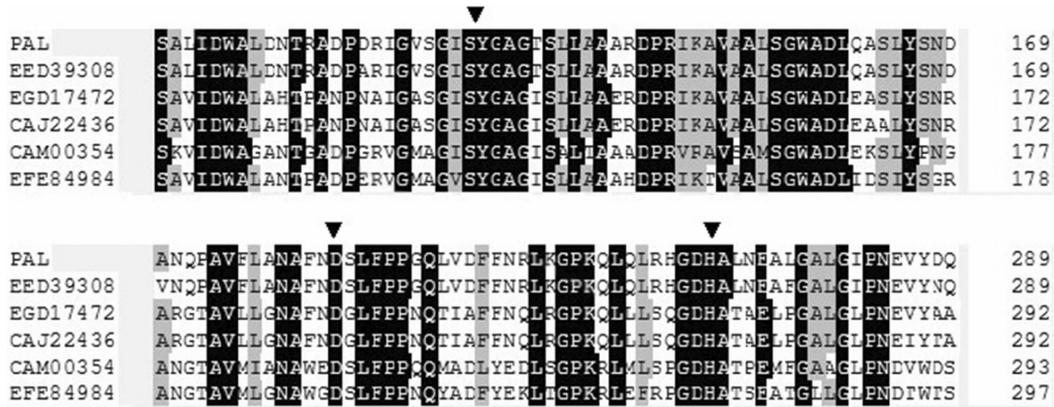


图 1 PAL 与 Esterase-lipase 超家族代表成员保守氨基酸序列的对比

Fig. 1 Alignment of conserved amino acid sequence between PAL and representative members of esterase-lipase superfamily

Note: Amino acid residues belonging to catalytic triad were presented as filled circles (▼). These sequences share a conserved motif Gly-Ile-Ser-Tyr-Gly, containing a serine residue located at the putative active site. The aligned sequences are: PAL: *Pseudomonas alcaligenes*; EED39308: *Stenotrophomonas* sp. SKA14; EGD17472: *Xanthomonas gardneri* ATCC19865; CAJ22436: *Xanthomonas campestris* pv. 85-10; CAM00354: *Saccharopolyspora erythraea* NRRL2338; EFE84984: *Streptomyces albus* J1074.

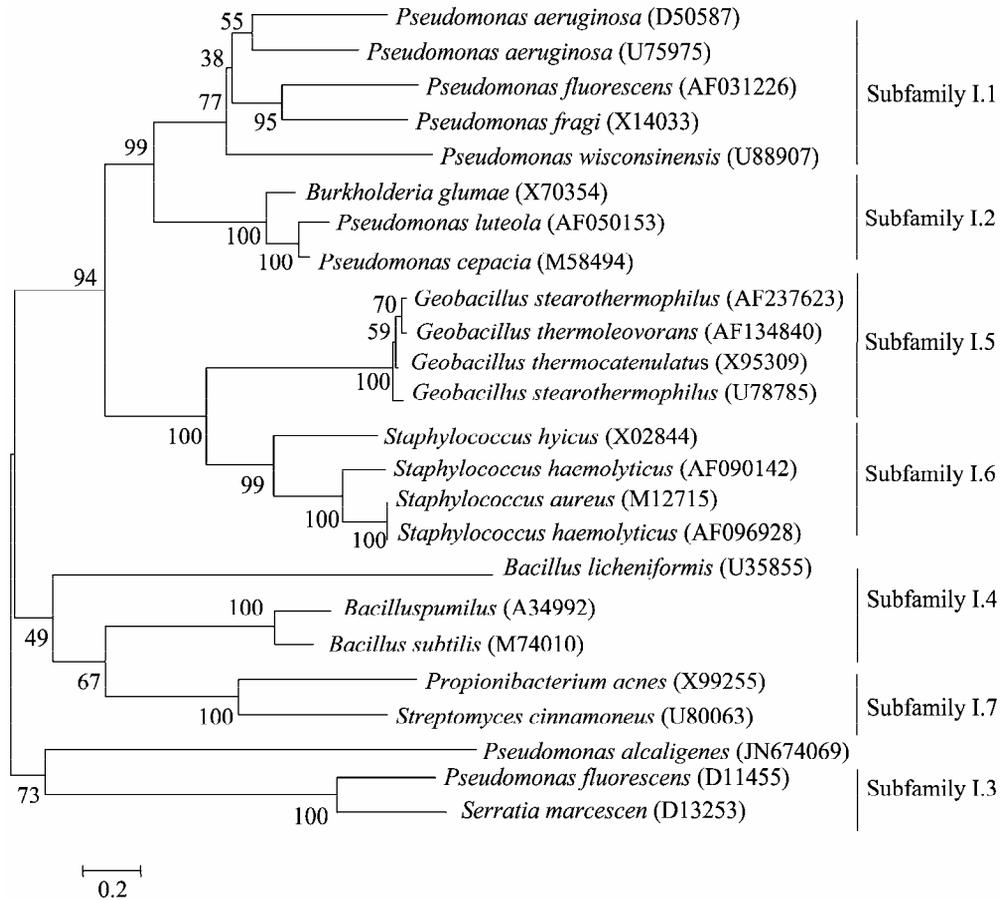


图 2 利用邻位相连法对 PAL 和 7 个亚家族的成员系统分析

Fig. 2 Unrooted Neighbor-Joining phylogenetic tree of PAL and other 7 members of Family I

Note: The tree was created by the program MEGA 4.1. Accession number were in the brackets. Bootstrap value was indicated at the respective nodes (1 000 replications). The scale bar measured the branch length and indicated the evolutionary distances.

2.2 重组 PAL 的表达与纯化

重组菌 *E. coli* [pET30a(+)-pal] 诱导表达经 SDS-PAGE 验证, 得到分子量大约为 55 kD 的重组酶。目标蛋白表达量约为 1.4 g/L, 占细胞总蛋白的 40% 左右, 实现高效表达。如图 3 所示, 超声细胞破碎后, PAL 主要存在上清中, 少量处于细胞沉淀当中。重组 PAL 水解 *p*-NPO 的活力达到 89 U/mL; 对 DL-薄荷丙酸酯拆分活力研究表明, 重组 PAL 高对映体选择性水解 L-薄荷丙酸酯为 L-薄荷醇, 当有效转化率达 100% 时, ee_p 大于 99%。重组 PAL 和 His-Tag 组成的融合蛋白经纯化脱盐处理后, 酶活达到 275 U/mg, SDS-PAGE 检测到单一条带如图 3 所示, 纯度达到 95% 以上, 纯化倍数为 4.7 倍, 酶回收率为 18.4%。

2.3 PAL 酶学性质分析

2.3.1 最适反应温度以及温度稳定性: 如图 4 所示, 以 1 mmol/L 的 *p*-NPO 为底物, 测得 PAL 最适反应温度为 35 °C, 与假单胞菌 KB700A^[12], 假单胞菌 S5^[13], 荧光假单胞菌 MC50^[14] 的脂肪酶最适反应

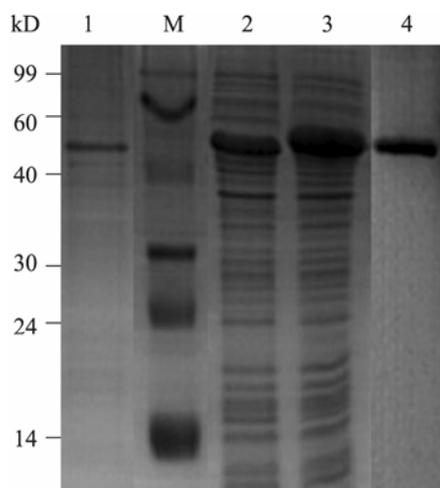


图 3 重组 PAL 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Analysis of purified recombination PAL by SDS-PAGE

Note: 1: Precipitation of *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+)-pal induced by IPTG for 10 h; 2: Supernatant of *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+)-pal induced by IPTG for 10 h; 3: Whole cell of *E. coli* BL21(DE3)-pET-30a(+)-pal induced by IPTG for 10 h; 4: Purified protein PAL; M: Protein marker.

温度一致。重组酶热稳定性研究表明该酶在 30 °C 以下具备较好的稳定性, 超过 40 °C 快速失活。当温度大于 60 °C 时, 脂肪酶基本失活, 与报道的来自于荧光假单胞菌 B68^[15] 脂肪酶热稳定性相一致。

2.3.2 最适反应 pH 以及 pH 稳定性: 如图 5 所示, 在最适反应温度下, 最适反应 pH 为 9.0, 且在 pH 8.5–10.0 范围内相对酶活在 70% 以上。在 pH 稳定性方面, PAL 在 pH 6.0–11.0 之间稳定性较好, 维持 75% 以上的酶活力, 与报道的类产碱假单胞菌 F-111^[16] 脂肪酶 pH 稳定性 (pH 6.0–10.0) 相似。

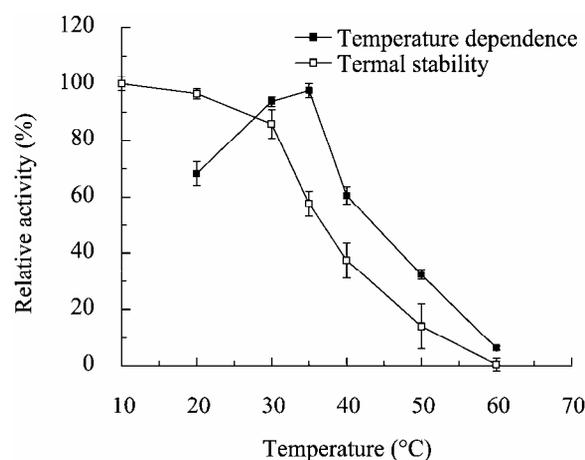


图 4 温度对重组酶 PAL 活性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on the recombination PAL activity

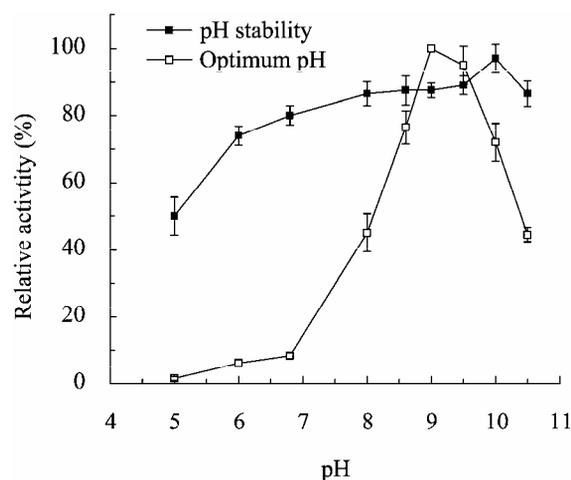


图 5 pH 对重组酶 PAL 活性的影响

Fig. 5 Effects of pH on the recombination PAL activity

2.3.3 PAL 的底物特异性: 在 pH 9.0、35 °C 条件下考察 PAL 对对硝基苯酚酯(C₂-C₁₆)的底物特异性, 结果表明 PAL 最适底物为 *p*-NPO。PAL 对 C₂、C₄底物的酶活分别仅为前者的 2%、4% (图 6)。

2.3.4 PAL 界面活性: 如图 7 所示, 当橄榄油体积比达到 1%时, PAL 出现明显的界面激活现象。

2.3.5 金属离子对酶的影响: 表 1 为 1、10 mmol/L 金属离子的存在对重组脂肪酶催化活性的影响,

结果显示, 当浓度为 1 mmol/L 时, Cu²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ 能明显增强酶的催化活力, 其中 Cu²⁺ 对 PAL 的激活作用明显, 残余活力是原来的 156%。大部分脂肪酶受 Zn²⁺ 抑制, 例如草莓假单胞菌 22.39B^[15]脂肪酶, Ca²⁺激活例如莓实假单胞菌 IFO3458^[18], 但 Zn²⁺对 PAL 有激活作用, 残余酶活达 144%。当浓度达到 10 mmol/L, Co²⁺对酶有激活作用, 残余酶活为 120%。1 mmol/L 和 10 mmol/L 的 EDTA 对酶活均无明显的作用, 这一点与绿脓假单胞菌 EF2^[19]脂肪酶一致。

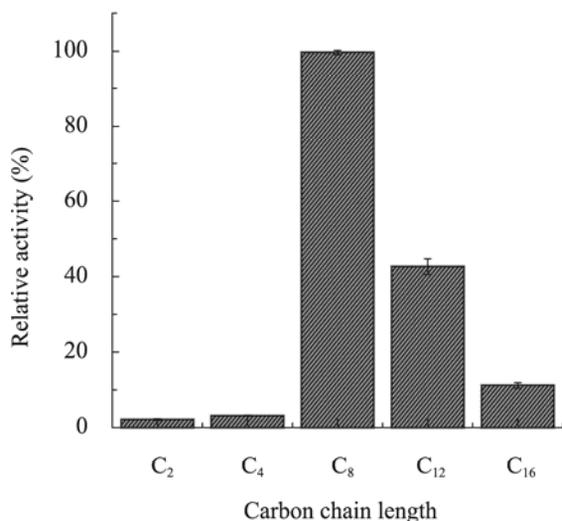


图 6 重组脂肪酶 PAL 的底物特异性
Fig. 6 Substrate specificity of the recombinant PAL

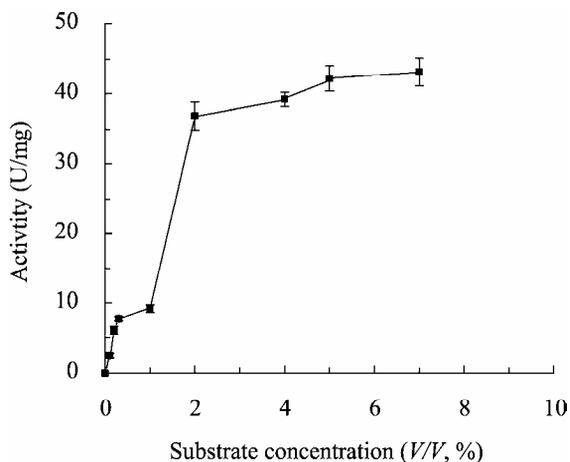


图 7 PAL 界面激活效应: 橄榄油浓度增大对脂肪酶催化活力的影响
Fig. 7 Influence of olive oil concentration on PAL specific hydrolytic activity

表 1 金属离子对脂肪酶 PAL 活性的影响 Table 1 Effects of various metal ions on the activity of PAL		
金属离子 Metal ions	相对活力 Relative activity (% , $x \pm s$)	
	1 mmol/L	10 mmol/L
K ⁺ (KCl)	74±0.4	107±0.5
Na ⁺ (NaCl)	106±0.9	94±0.6
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	108±2.1	77±1.3
Co ²⁺ (CoCl ₂)	104±0.8	120±0.7
Cu ²⁺ (CuSO ₄)	156±3.7	61±1.1
Mg ²⁺ (MgSO ₄)	143±2.3	89±1.4
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	132±1.5	54±0.7
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	144±2.9	92±2.1
EDTA	96±2.5	74±0.8

2.3.6 PAL 反应动力学常数测定: 根据 Michaelis-Menten 方程, 双倒数作图法测得 PAL 对 *p*-NPO 的动力学参数 K_m 和 V_{max} , 其值分别为 80 μmol/L, 290 mmol/(min·g protein), 显示出对 *p*-NPO 较好的亲和力。

3 结论

目前产碱假单胞菌脂肪酶的研究鲜见报道, 且序列同源性较低, 甚至低于大多数来自不同物种的同一家族的脂肪酶基因的序列一致性。大部分产碱假单胞菌脂肪酶具备 N 端信号肽和二硫键, 获得正确构型需要折叠蛋白的参与, 并通过

GSP 分泌途径将成熟脂肪酶分泌到胞外^[20]。本研究通过构建基因文库, 成功克隆到产碱假单胞菌脂肪酶的基因, 并实现其在 *E. coli* BL21(DE3) 中的高效表达。成熟 PAL 无 N 端信号肽和二硫键, 预测保守五肽结构为 Gly¹³¹-Ile¹³²-Ser¹³³-Tyr¹³⁴-Gly¹³⁵, 与之前报道的脂肪酶亚家族 I.3 主要以 Gly-His-Ser-Leu-Gly 为保守的五肽结构不同。通过氨基酸序列的对比, 预测含有 ATP 结合域, 该区域一般存在于 ABC 分泌机制菌种中, 与所报道的产碱假单胞菌脂肪酶的分泌方式不同。酶学性质的研究表明, 该酶表现出对中长链底物的良好适应性, 以及在较宽范围内 pH 稳定性, 但该酶热稳定性差, 酶的热稳定性受很多因素影响, 例如氨基酸组成、二硫键、疏水作用、离子对、多聚体和 α -螺旋的双电极稳定化作用等。由于 PAL 没有半胱氨酸, 缺乏二硫键, 可能对该酶的热稳定性方面存在一定的影响。在金属离子方面, 脂肪酶的活力常受重金属离子 Co^{2+} 的强烈抑制, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 轻微抑制, 但 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 可使 PAL 活力提高 1.3 倍以上, 10 mmol/L 的 Co^{2+} 可将酶活提高 1.2 倍。在拆分活力方面的研究显示, PAL 高对映体选择性水解 L-薄荷丙酸酯, 有效转化率为 100%, ee_p 大于 99%。今后的工作主要通过定向进化和酶的体外修饰等方法提高酶的稳定性和选择性, 并选择合适的外分泌载体和宿主实现 PAL 的外分泌表达, 为制备 L-薄荷醇奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Petersen MTN, Fojan P, Petersen SB. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 85(2): 115-147.
- [2] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13(4): 390-397.
- [3] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(6): 763-781.
- [4] Athawale V, Manjrekar N, Athawale M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of (\pm)-menthol[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 16(3/4): 169-173.
- [5] Chaplin JA, Gardiner NS, Mitra RK, et al. Process for Preparing (-)-Menthol and Similar Compounds: US, 7026144B2[P]. 2006-04-11.
- [6] 杨安钢, 毛积芳, 药立波. 生物化学与分子生物学实验技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 247.
- [7] Yamada K, Ota Y, Machida H. A modified method for lipase activity assay with emulsified olive oil as substrate[J]. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1962, 36(10): 860-864.
- [8] Martinelle M, Holmquist M, Hult K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1258(3): 272-276.
- [9] Doung F, Soscia C, Lazdunski A, et al. The *Pseudomonas fluorescens* lipase has a C-terminal secretion signal and is secreted by a three-component bacterial ABC-exporter system[J]. *Molecular Microbiology*, 1994, 11(6): 1117-1126.
- [10] Kawai E, Idei A, Kumura H, et al. The ABC-exporter genes involved in the lipase secretion are clustered with the genes for lipase, alkaline protease, and serine protease homologues in *Pseudomonas fluorescens* no. 33[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1446(33): 377-382.
- [11] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 343(1): 177-183.
- [12] Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. Low-temperature lipase from *Psychrotrophic pseudomonas* sp. strain KB700A[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(9): 4064-4069.
- [13] Baharum SN, Salleh AB, Razak CNA, et al. Organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas* sp.

- strain S5: stability of enzyme in organic solvent and physical factors affecting its production[J]. *Annals of Microbiology*, 2003, 53: 75–83.
- [14] Bozoglu F, Swaisgood HE, Adams DM Jr, et al. Isolation and characterization of an extracellular heat-stable lipase produced by *Pseudomonas fluorescens* MC50[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 1984, 32(1): 2–6.
- [15] Luo Y, Zheng YT, Jiang ZB, et al. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification[J]. *Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins*, 2006, 73(2): 349–355.
- [16] Lin SF, Chiou CM, Yeh CM, et al. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(3): 1093–1095.
- [17] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1999, 53: 315–321.
- [18] Gilbert EJ, Cornish A, Jones CW. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2[J]. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137(9): 2223–2229.
- [19] Gerritse G, Ure R, Bizoullier F, et al. The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production[J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, 64(1): 23–38.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,微生物学涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,为某个领域的科研人员提供一个交流的平台,《微生物学通报》编委会决定自2008年起,每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面,请申请者仔细阅读;
2. 提交形式:请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表;填写好之后,以E-mail附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 请在邮件主题中注明:“专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部,联系方式: Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn