

# 新颖微生物低温酯酶 EstP8 的酶学性质研究 与在手性催化中的应用\*

公颜慧<sup>1</sup> 马三梅<sup>1\*\*</sup> 张云<sup>2,3</sup> 王永飞<sup>1</sup> 胡云峰<sup>2,3\*\*</sup>

(1 暨南大学生物工程学系 广州 510632)

(2 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广州 510301)

(3 中国科学院南海海洋研究所 广东省海洋药物重点实验室 广州 510301)

**摘要** 从假单胞菌 *Pseudonocardia antitumoralis* HUP007 基因组中克隆了一个 1 041bp 的酯酶基因 *EstP8*, 编码的蛋白具有 377 个氨基酸残基。在 *E. coli* BL21 (DE3) 中实现酯酶 *EstP8* 的高效异源表达和纯化。*EstP8* 为脂肪酶家族 IV 中的一员, 具有 HGGG 保守序列。*EstP8* 最适底物为对硝基苯酚乙酸酯 (p-NPO), 最适温度和 pH 分别为 50°C 和 8.0。*EstP8* 催化 p-NPO 水解反应的活性、 $V_{max}$  和  $K_m$  分别达到 105.19U/mg、89.4 $\mu$ M/min、1.144mM。*EstP8* 在 pH7.0~8.0 范围内具有良好的 pH 稳定性; 在 4°C 时, 酯酶相对活力为 41.78%, 在 10~40°C 内具有很好温度稳定性。*EstP8* 对大部分金属离子有很好的耐受性, 低浓度的  $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  对该酶的活性有激活作用。辛烷、庚烷、甲苯、丙酮、DMF 等有机溶剂对 *EstP8* 的活性同样具有激活作用。酯酶 *EstP8* 还可以通过水解拆分高效地制备手性 (*R*)-1-苯基乙醇; 添加有机溶剂可以很好地促进该酯酶的光学选择性和产率, 在共溶剂甲苯的存在下, 所制备的 (*R*)-1-苯基乙醇的 *e. e.* 和产率可达 91% 和 18%; 在共溶剂 DMSO 的存在下, 所制备的 (*S*)-乙酸苏合香酯的 *e. e.* 和产率可达 98% 和 60%。酯酶 *EstP8* 在手性生物催化等诸多工业领域有很好的应用潜力。

**关键词** 低温酯酶 金属离子耐受性 有机溶剂耐受性 手性拆分 高对映选择性

中图分类号 Q819

酯酶是一类可以将酯类水解成酸类和醇类的水解酶。酯酶主要来源于动物的胰脏, 高等植物及微生物<sup>[1-2]</sup>。酯酶属于  $\alpha/\beta$  折叠水解酶超家族<sup>[3]</sup>。催化中心一般由丝氨酸、天冬氨酸和组氨酸组成<sup>[4]</sup>。丝氨酸通常位于活性位点基序 G-X-S-X-G 中<sup>[5-6]</sup>。微生物酯酶是一种重要的工业酶, 能催化酯的合成、转酯和水解等反应<sup>[7-9]</sup>, 具有反应条件温和、催化活性高、选择性强、产物易于分离回收等优点, 可广泛地应用于食品加工、精细化工、手性化合物合成以及环境治理等工业

领域<sup>[2, 4, 10-17]</sup>。

微生物脂肪酶分为 15 个家族, 假单胞菌酯酶主要集中在脂肪酶家族 I。脂肪酶家族 IV 是激素敏感脂肪酶 (HSL), 与哺乳动物的 HSL 的氨基酸序列相似<sup>[18-19]</sup>。尽管许多家族 IV 的脂肪酶基因被报道, 但是对其酶学性质的报道却很少<sup>[20-21]</sup>。

含芳香基的光学醇是手性药物合成中重要的手性中间体。微生物酶法拆分手性醇是获得单一对映体手性醇的一种重要途径<sup>[8, 22]</sup>。光学纯  $\alpha$ -苯乙醇在药物和精细化工中具有重要的应用价值。例如, 光学纯  $\alpha$ -苯乙醇可通过抑制吸收来降低胆固醇水平, 光学纯  $\alpha$ -苯乙醇由于具有温和的花香气味还被广泛应用于香料行业<sup>[23]</sup>。为获得具备专一性拆分制备光学纯  $\alpha$ -苯乙醇的酯酶, 本研究对 *Pseudomonas antitumoralis* HUP007 的

收稿日期: 2016-03-16 修回日期: 2016-05-30

\* 国家自然科学基金青年科学基金项目 (21302199)、中国科学院战略性先导科技专项 (XDA11030404)、中国科学院重点部署项目 (KGZD-EW-606)、广州市科技计划 (210510010012) 资助项目

\*\* 通讯作者, 电子邮箱: yunfeng.hu@scsio.ac.cn; wyfmsm@163.com

全基因组进行测序,克隆了酯酶 EstP8 的编码基因,并在大肠杆菌中实现了 EstP8 的重组表达,对其酶学性质和在手性催化中的应用进行了研究,为其工业化应用奠定了良好的基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3)和载体 pET28a(+)均为本实验室保存。假单胞菌 *Pseudomonas antitumoralis* HUP007 由本实验室从中山大学校园土壤样品中筛选获得。

1.1.2 试剂 主要试剂:限制性内切酶 *Eco*RI、*Xho*I 等购自 Thermo Fisher Scientific 公司;T4 DNA 连接酶和 Taq DNA 聚合酶购自北京全式金生物科技有限公司;DNA Marker, DNA 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司;质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物科技有限公司;Ni Sephrose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow 和 PD-10 脱盐柱购自 GE Healthcare Life Sciences 公司;乙酸苏合香酯购自上海阿达玛斯试剂有限公司,产品编号 90936A;其他试剂皆为分析纯。

1.1.3 仪器 PCR 仪:美国伯乐 S1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler;摇床:上海世平叠加式摇床 PJS-2012R;冷冻离心机:德国 Beckman Allegra X-30R;酶标仪:瑞士 Tecan Infinite M200 Pro;高压灭菌锅:日本松下 MLS-3781L-PC;超声破碎仪:宁波新芝生物科技股份有限公司 SCIENTZ-II D;冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;气相色谱仪:浙江福立分析仪器有限公司;pH 计:德国 Sartorius DB-10。

### 1.2 方法

1.2.1 酯酶 EstP8 基因序列分析 利用生物信息学手段对基因组进行注释,确定酯酶 EstP8 的开放阅读框,信号肽序列采用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测,预测氨基酸一致性分析采用 PSI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)。Clustal W 1.81c 对测序后的基因进行拼接,软件 DNAMAN 分析同源性,软件 MEGA 5 构建进化树。酯酶基因的理论蛋白质分子量及等电点采用 Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))来预测。

1.2.2 酯酶基因的克隆及载体构建 EstP8 成熟肽利用软件 Primer Premier 5 设计引物如下:上游引物:5'-CATGAATTCGACGCTGGCGTCGAGCAC-3' 下游引物:5'-CACCTCGAGTTACTTCAAATGCACTTTCAGCGCCTC

-3',下划线部分分别为 *Eco*RI 和 *Xho*I 酶切位点。以 *Pseudomonas antitumoralis* HUP007 的总 DNA 为模板,PCR 扩增成熟酯酶序列。具体过程:95 $^{\circ}$ C 预变性 5min,95 $^{\circ}$ C 变性 30s,55~65 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,进行 32 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。凝胶电泳检测 PCR 产物并胶回收。PCR 产物经 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切后与载体 pET28a(+)连接,转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。将重组菌涂布到筛选平板,37 $^{\circ}$ C 培养 24h,挑选阳性克隆,提取质粒并进行序列测序。

1.2.3 酯酶 EstB5 的表达和纯化 将测序正确的重组质粒 pET28(+)-EstP8 转入 *E. coli* BL21(DE3)中,将 *E. coli* BL21(DE3)涂布到 100mg/ml 卡那霉素的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后,挑取单菌落于含卡那霉素 LB 液体培养基中进行培养。取样测定菌体浓度达到 OD<sub>600</sub> 为 0.8 左右时,加入 0.2mmol/L IPTG 在 22 $^{\circ}$ C 诱导 16~20h。4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体,用预冷的 50mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液冲洗菌体并重悬浮,置于冰上超声破碎,将破碎完的菌体裂解液在 4 $^{\circ}$ C 下 9 000 r/min 离心 30 min,将 10ml 上清转移到 50mmol/L 的 pH7.5 的 Tris-HCl 缓冲液预先平衡的镍柱中,用 40mmol/L 咪唑缓冲液冲洗杂蛋白,用 300mmol/L 的咪唑缓冲液洗脱目的蛋白。得到的酶溶液用脱盐柱脱盐。取全菌体、上清和沉淀用 12% 的 SDS-PAGE 进行凝胶电泳检测。

1.2.4 酯酶活性测定 酯酶活性测定采用比色法,酶活力单位定义为每分钟水解 p-NPO 为 1 $\mu$ mol p-NP 所需要的酶量。蛋白浓度采用 Bradford 法测定,以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.2.5 酯酶 EstP8 的底物特异性 以不同长度酰基的对硝基苯酚酯(C2-C12)为底物,在标准条件下测定 EstP8 最适底物的相对活性,以不加酶的作为对照组。

1.2.6 酯酶 EstP8 的最适反应温度及温度稳定性 利用 p-NP 法在 10 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C 之间测定酯酶 EstP8 酶活力,确定最适温度,以酶活力最高点的相对酶活力为 100%。将酶溶液于不同温度(10 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C)处理不同时间,每隔 15min 测一次酶活,以不处理的酶活力为对照,设为 100%。

1.2.7 酯酶 EstP8 的最适 pH 及 pH 稳定性 配制不同 pH(6.0~9.5)缓冲液(其中 6.0~8.0 为 50mmol/L PBS;8.0~9.5 为 50mmol/L Tris-HCl),室温条件下反应 5min,测定酶活力,以酶活力最高点的相对酶活力为 100%,确定最适 pH。将酶溶液置于不同 pH 缓冲液

中,4℃处理 12h,测定残余酶活力,以不做处理的酶活力为 100%,探究酯酶 EstP8 的 pH 稳定性。

1.2.8 金属离子对酶的影响 将终浓度为 1mmol/L、5mmol/L、10mmol/L 的金属离子 ( $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $K^{+}$ ) 与适当浓度的 EstP8 混匀,室温处理 1h,在 50℃,pH8.0 Tris-HCl 缓冲体系中测定残余酶活力,处理前的酶活力为 100%。

1.2.9 有机溶剂及表面活性剂对酯酶 EstP8 活性的影响 将不同浓度的有机溶剂、表面活性剂与适当浓度的酯酶 EstP8 混匀,室温条件下处理 3h,在最适条件下测定酶活力。以未做任何处理的酶活力为 100%。

1.2.10 酯酶 EstP8 水解拆分乙酸苏合香酯 将 10mg 的粗酶粉和 50mmol/L 的底物加入到 500 $\mu$ l Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L pH8.0)中,37℃反应 6h,乙酸乙酯 1:1 萃取,无水  $Na_2SO_4$  除水,进行手性气相色谱检测。色谱条件:进样口、检测口 250℃(初温 100℃,10℃/min 升温至 250℃并保留 10min)。计算转化率( $c$ )和对映体过量值( $e.e.$ )。在上述体系中加入 10% 的有机溶剂(甲苯、异辛烷、庚烷、正己烷等)同样条件下反应 6h,进行手性气相检测并计算转化率及对映体过量值,考察有机溶剂对 EstP8 催化乙酸苏合香酯手性拆分的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酯酶 EstP8 的序列分析

酯酶基因 *EstP8* 全长 1041bp,编码 337 个氨基酸残基,Primer Premier 5 软件分析表明其 G + C 含量 59%。ExPASy 分析显示该酯酶含有大小为 22 个氨基酸残基的信号肽。切除信号肽后的酯酶由 315 个氨基酸残基组成,理论蛋白质分子量为 36.5kDa,等电点为 8.10。NCBI 比对结果显示:EstP8 基因序列与来自 *Pseudomonas* sp. 250J 和 *Pseudomonas mosselii* 的假定  $\alpha/\beta$  水解酶基因有 98% 的相似性,与来自 *Pseudomonas* sp. GM67 的假定酯酶有 94% 相似性,与 *Pseudomonas batumi* 的假定  $\alpha/\beta$  水解酶具有 94% 的相似性,与来自 *Pseudomonas* sp. GM55 的假定酯酶、*Pseudomonas lutea* 的假定  $\alpha/\beta$  水解酶、*Pseudomonas viridiflava* 的假定  $\alpha/\beta$  水解酶序列相似性分别为 93%、89% 和 88% (图 1)。虽然 EstP8 与这些序列的相似性很高,但它们均来自全基因组测序,并没有进行过系统的酶学性质研究。*EstP8* 编码区蛋白质序列及结构分析结果表明:EstP8 属于脂肪酶家族 IV,具有脂肪酶家族 IV 特征序列

HGGG<sup>[16,18]</sup>。与所有水解酶类似,EstP8 具有  $\alpha/\beta$  水解酶折叠结构域,催化中心由 Ser<sup>180</sup>、Asp<sup>277</sup>、His<sup>307</sup> 组成,其中 Ser<sup>180</sup> 位于脂肪酶特征序列 Gly<sup>178</sup>-Gln<sup>179</sup>-Ser<sup>180</sup>-Val<sup>181</sup>-Gly<sup>182</sup>(GX SXG)中<sup>[24]</sup>,是组氨酸水解酶最保守的区域,也是水解机制所必需的序列。采用 Mega5 软件的邻接法对 EstP8 进行系统树分析,构建进化树如图 2 所示。

### 2.2 酯酶 EstP8 的表达纯化

成功构建的表达载体 pET28a(+)-EstP8,转入感受态 *E. coli* BL21(DE3),并实现在 *E. coli* BL21(DE3) 中的高效表达。通过 Ni-NTA 柱纯化,SDS-PAGE 检测显示单一目的蛋白条带大约为 36.5kDa(图 3),说明 EstP8 与理论大小一致。

### 2.3 酯酶 EstP8 的底物特异性

EstP8 对不同长度酰基的对硝基苯酚酯活性如表 1,该酶能催化 C2-C10 链的对硝基苯酚酯,催化短链酯的活性高于中链和长链酯。EstP8 最佳的作用底物是对硝基苯酚乙酸酯 C2(*p*-NPO)。以 *p*-NPO 为底物,酯酶 EstP8 的活性达到 105.19U/mg,  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为 1.144mmol/L,89.4 $\mu$ M/min。

表 1 酯酶 EstP8 的底物特异性

Table 1 Substrate specificity of EstP8

Substrats	Specific activity (U/mg)	Relative activity (%)
p-NP acetate (C2)	105.19 $\pm$ 5.28	100
p-NP butyrate (C4)	43.11 $\pm$ 3.23	41
p-NP hexanoate (C6)	34.22 $\pm$ 1.81	33
p-NP caprylate (C8)	16.67 $\pm$ 0.99	16
p-NP decanoate (C10)	5.26 $\pm$ 0.31	5

### 2.4 酯酶 EstP8 的最适 pH 和 pH 稳定性

pH 对重组酯酶 EstP8 活性的影响见图 4a,在 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲体系中,EstP8 在 pH8.0 时活性最高,pH 值在 7.0~9.5 之间时 EstP8 有较高的酶活性。当 pH 低于 7 或高于 9 时,EstP8 活性迅速降低。EstP8 用不同 pH 的缓冲液处理 22h 后,pH 在 8.0 时酶活性较稳定(图 4d),pH9.0 时酶活性残余 50.35%。而在过酸或过碱条件下,酶活力丧失则较为明显。

### 2.5 酯酶 EstP8 的最适温度及温度耐受性

在最适反应 pH 条件下测得酯酶 EstP8 催化水解 *p*-NPO 反应最适温度为 50℃(图 4c),酯酶 EstP8 在 4℃时残余酶活力达 41.78%,在 20℃酶残余活力达到

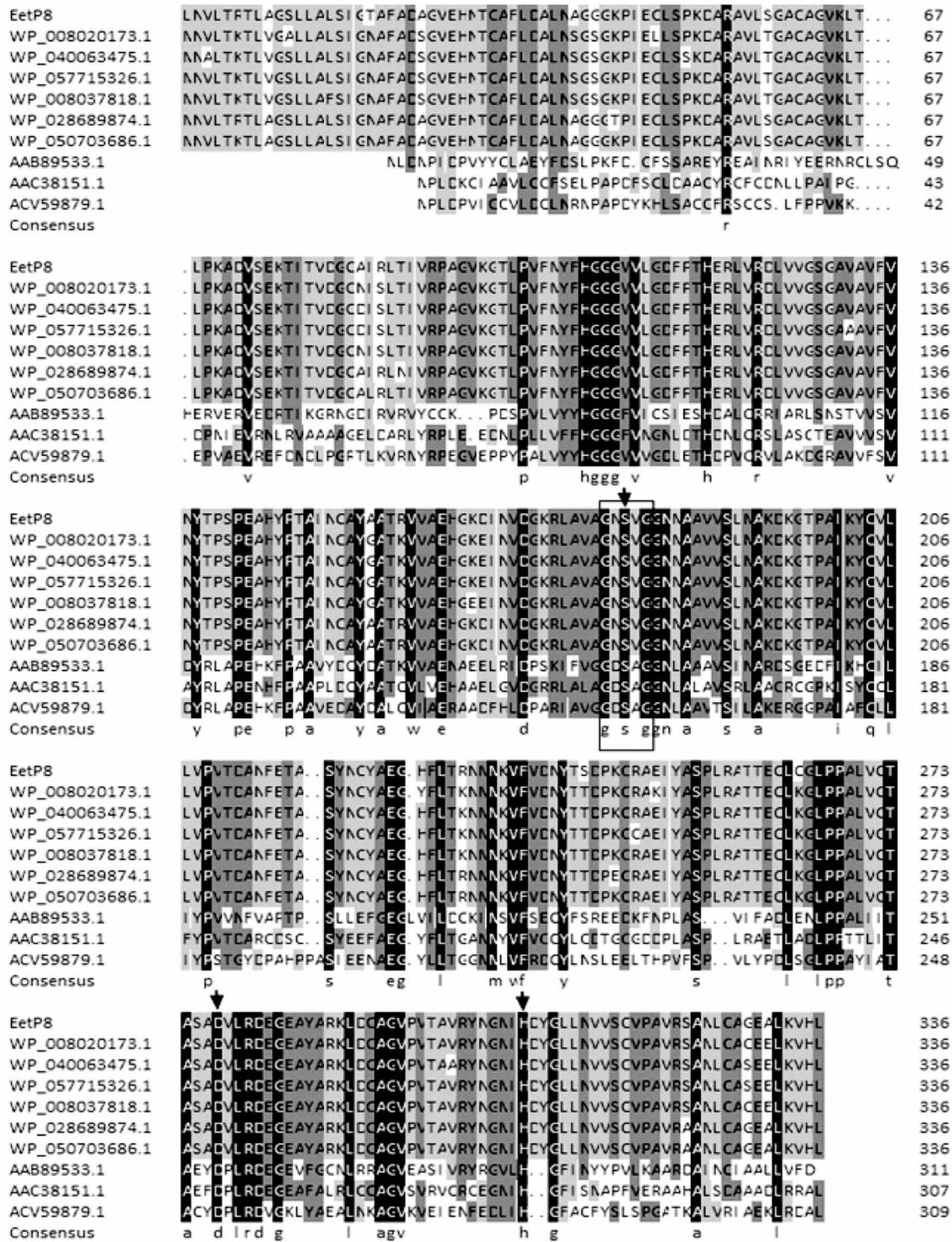


图1 EstP8 全序列比对图

Fig.1 Multiple sequence alignment of EstP8

Note; Amino acid residues belonging to catalytic triad were presented as filled circles ( ↓ ). These sequences share a conserved motif Gly-Gln-Ser-Val-Gly, containing a serine residue located at the putative active site. The aligned sequences are EstP8; WP\_008020173.1; *Pseudomonas* sp. GM55; WP\_040063475.1; *Pseudomonas batumici*; WP\_057715326.1; *Pseudomonas fluorescens*; WP\_008037818.1; *Pseudomonas* sp. GM67; WP\_028689874.1; *Pseudomonas mosselii*; WP\_050703686.1; *Pseudomonas mosselii*; AAB89533.1; *Archaeoglobus fulgidus* DSM4304; AAC38151.1; *Pseudomonas* sp. B11-1; ACV59879.1; *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Acidocaldarius* DSM446

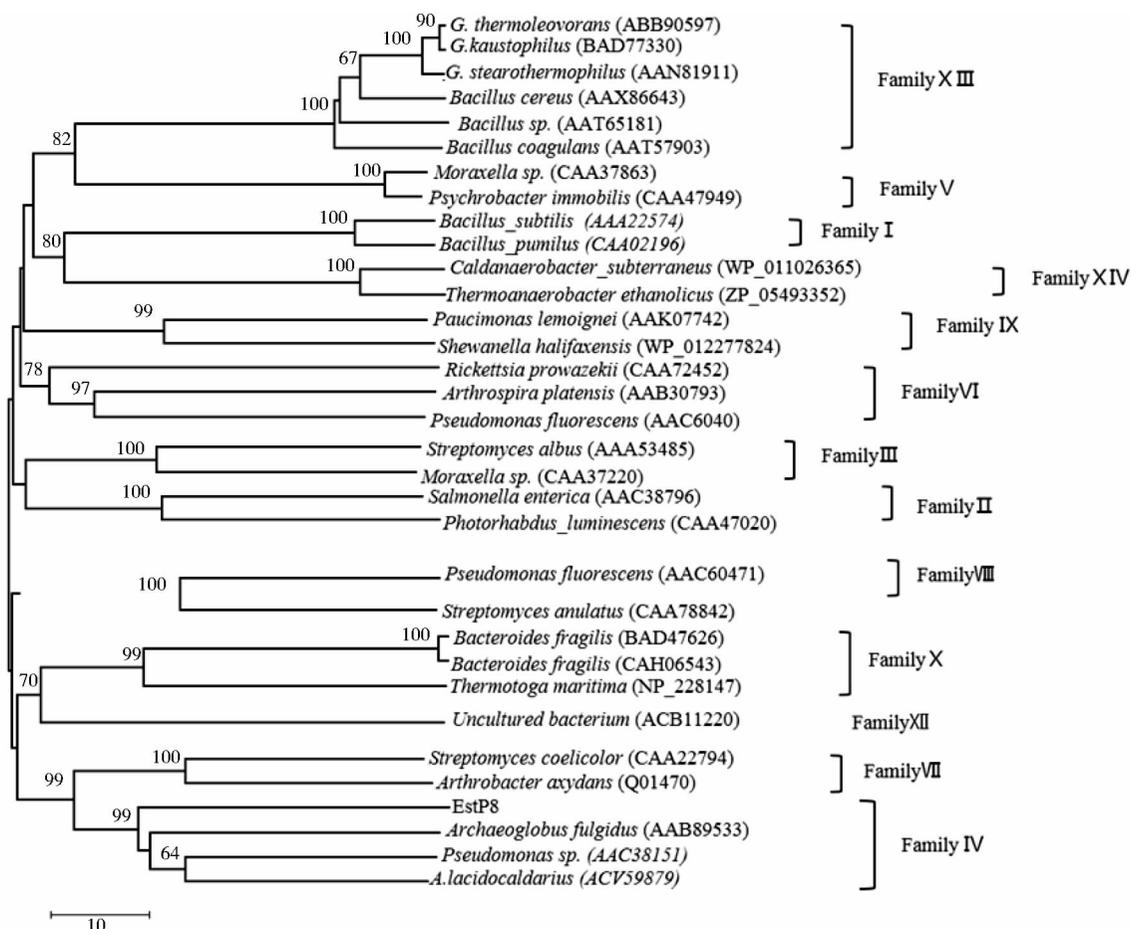


图 2 酯酶 EstP8 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of esterases generated with MEGA v5.0 using the neighbor-joining meth

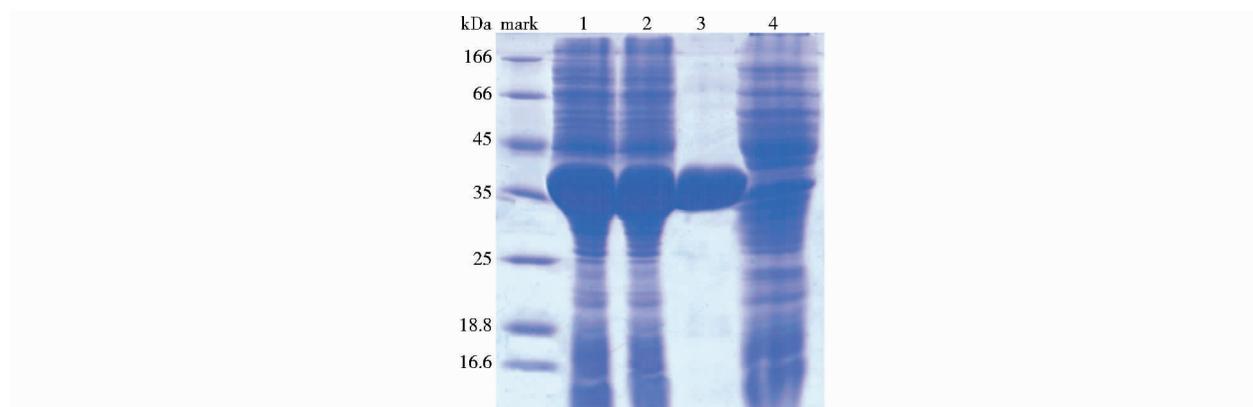


图 3 酯酶 EstP8 的蛋白表达、纯化

Fig. 3 Expression and purification of EstP8

1; Protein supernatants of EstP8 after IPTG induction; 2; Total proteins after IPTG induction 3; Purified EstP8; 4: Total proteins before IPTG induction

89.48%, 温度大于 50℃ 时酶活性急剧下降。EstP8 在 0~50℃ 经不同时间处理保持稳定的酶活力, 随着处理温度的升高, EstP8 残余酶活力逐渐下降, 当温度高于

50℃ 时酶活性急剧降低(图 4c)。在 60℃ 处理 15min 后, 基本完全失活(图 4c)。

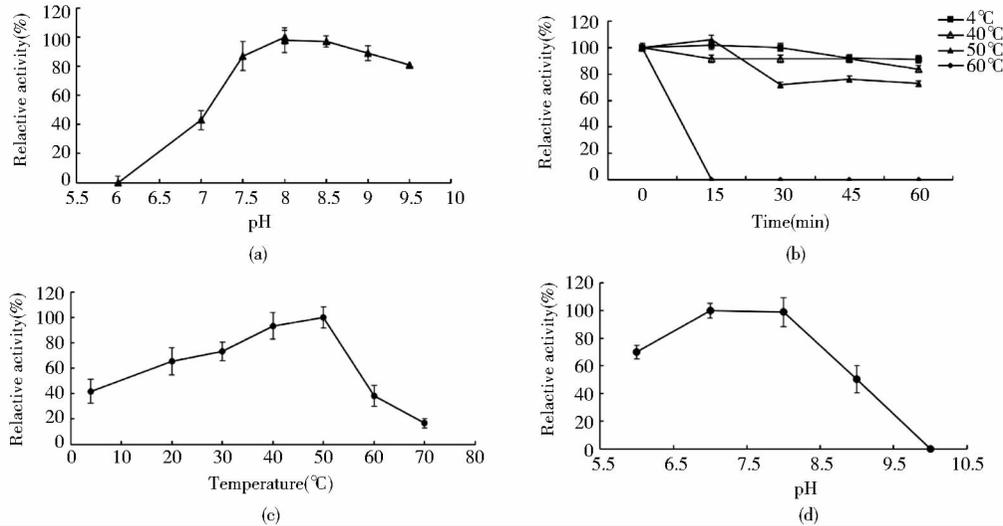


图 4 pH 与温度对 EstP8 的活性及稳定性的影响

Fig. 4 Effect of pH and temperature on the activity of EstP8

(a) Effect of pH on the activity of EstP8 (b) pH stability of EstP8 (c) Effect of temperature on the activity of EstP8 (d) Temperature dependence of EstP8 enzymes activity

## 2.6 不同浓度金属离子对酯酶 EstP8 水解活性的影响

不同浓度的金属离子对酶活性的影响见表 2: 在最适条件下测定酶活, 1mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对 EstP8 具有明显的激活作用, 分别达到对照的 118.50 ± 0.315%、131.89 ± 0.017%、175.35 ± 0.093%、当浓度

达到 10 mmol/L 时,  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  对 EstP8 酶活性产生明显的抑制, 分别为对照的 38.53 ± 0.076% 和 11.40 ± 0.029%。 $\text{K}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对酶活性影响较小。本部分结果表明酯酶 EstP8 对多种金属离子具有很好的耐受性。

表 2 金属离子对酶水解活力的影响

Table 2 Effect of metal ions on the hydrolysis activity of esterase EstP8

metalions	Relative activity (% , x ± s)		metalions	Relative activity (% , x ± s)	
	1mmol/L	10mmol/L		1mmol/L	10mmol/L
Control		100	Control		100
$\text{K}^{+}$	104.82 ± 0.128	103.50 ± 0.081	$\text{Ca}^{2+}$	104.08 ± 0.048	122.01 ± 0.14
$\text{Mn}^{2+}$	131.89 ± 0.017	121.01 ± 0.079	$\text{Zn}^{2+}$	175.35 ± 0.093	11.40 ± 0.029
$\text{Cu}^{2+}$	118.50 ± 0.315	38.53 ± 0.076	$\text{Mg}^{2+}$	113.10 ± 0.166	77.29 ± 0.052

## 2.7 有机溶剂、表面活性剂及变性剂对酯酶 EstP8 水解活性的影响

10% 的异辛烷、庚烷、1,4-二氯六环、甲苯、丙酮和 DMF 能够不同程度地促进 EstP8 活性, 其中丙酮和 DMF 的促进作用比较明显, 分别达到对照的 140.92 ± 0.061%、177.36 ± 0.083% (表 3)。甲醇、乙醇、二氯甲烷、乙腈、DMSO 对 EstP8 的活性具有不同程度的抑制作用, 乙醇和乙腈的抑制作用较强; 加入 10% 浓度的

上述溶剂, 残余酶活力分别为 35.01 ± 0.019% 和 27.10 ± 0.043%。随着有机溶剂浓度的升高, 对 EstP8 的抑制作用加强, 但在 90% 的异辛烷和庚烷中 EstP8 的残余酶活力仍保留对照的 50% 以上, 因此 EstP8 对异辛烷及庚烷具有很强的耐受性。0.1% 的 TritonX-100、Tween-80、Tween-20 能对 EstP8 产生不同程度的抑制作用。

表3 有机溶剂对酶活力的影响

Table 3 Effect of some organic solvents on the hydrolysis activity of esterase EstP8

Organic solvents	Relative activity (% , $x \pm s$ )			
	10%	20%	50%	90%
Control	100%			
Methanol	78.03 $\pm$ 0.094	41.04 $\pm$ 0.022	32.95 $\pm$ 0.027	-
Ethanol	35.01 $\pm$ 0.019	20.46 $\pm$ 0.021	-	-
Isooctane	122.22 $\pm$ 0.054	120.80 $\pm$ 0.036	54.92 $\pm$ 0.046	50.02 $\pm$ 0.039
Dichloromethane	77.02 $\pm$ 0.063	32.41 $\pm$ 0.052	-	-
Heptane	115.25 $\pm$ 0.05	73.46 $\pm$ 0.050	92.19 $\pm$ 0.068	59.84 $\pm$ 0.016
1,4-Dioxane	116.15 $\pm$ 0.03	61.24 $\pm$ 0.050	-	-
Methylbenzene	130.95 $\pm$ 0.042	47.94 $\pm$ 0.057	55.55 $\pm$ 0.066	6.32 $\pm$ 0.056
Acetonitrile	27.10 $\pm$ 0.043	42.88 $\pm$ 0.018	-	-
Acetone	140.92 $\pm$ 0.061	62.24 $\pm$ 0.09	-	-
DMF	177.36 $\pm$ 0.083	80.72 $\pm$ 0.033	-	-
DMSO	85.06 $\pm$ 0.03	97.71 $\pm$ 0.132	35.84 $\pm$ 0.037	-

表面活性剂对酯酶水解活性的影响见表4。

表4 表面活性剂对酯酶水解活性的影响

Table 4 Effects of detergents on the hydrolysis activity of esterase EstP8

chemical reagent	Relative activity (% , $x \pm s$ )	
	0.1%	0.5%
Control	100%	
Triton-X100	79 $\pm$ 0.048	89 $\pm$ 0.054
Tween-80	58 $\pm$ 0.069	54 $\pm$ 0.078
Tween-20	75 $\pm$ 0.057	44 $\pm$ 0.038

## 2.8 酯酶 EstP8 水解拆分制备手性 1-苯基乙醇及有机溶剂对拆分的影响

EstP8 能高对映选择性水解乙酸苏合香酯制备手性 (*R*)-1-苯基乙醇,有效转化率(*c*)为 39%,产物 *e. e.* 值(*e. e. p*)达 78%。研究表明反应体系中加入 10% (*v/v*)的甲苯、丙酮、庚烷、正己烷等有机溶剂均能够提高产物 (*R*)-1-苯基乙醇 *ee<sub>p</sub>* 值,分别达到 91%、86%、86%、85%。而在 10% DMSO 存在的情况下,底物 (*S*)-乙酸苏合香酯的 *e. e. s* 达到 98%,转化率提高至 60% (表 5)。本部分结果表明酯酶 EstP8 具有很高的拆分制备 (*R*)-1-苯基乙醇等手性化合物的能力,添加有机溶剂可以提高该酯酶的光学选择性和产率。

表5 有机溶剂对酯酶 EstP8 水解拆分 ( $\pm$ )-乙酸苏合香酯的影响Table 5 Effect of organic solvents on the kinetic resolution of ( $\pm$ )-1-phenylethyl acetate by esterase EstP8

Organic solvents (10%)	<i>e. e. s</i> (%)	<i>e. e. p</i> (%)	<i>c</i> (100%)
Control	50	78	39
Methylbenzene	20	91	18
Acetone	58	86	40
Heptane	70	86	45
Isooctane	75	84	47
1,4-Dioxane	77	83	48
Hexane	56	85	40
DMSO	98	64	60
DMF	74	78	49

## 3 结论

EstP8 属于脂肪酶家族 IV,具有脂肪酶家族 IV 保守序列 HGGG<sup>[16, 18]</sup>。与其他低温酯酶相比较,EstP8 具有更好的温度稳定性(表 5)。EstP8 的最适反应温度为 50℃。4℃ 时,酯酶 EstP8 的相对活力为 41.78%。EstP8 在 40℃ 处理 60min 后残余酶活力保持在 80% 以上,50℃ 处理 60min 后的残余酶活力仍然保持在 60%

以上。EstP8 的最适 pH 为 8.0, pH 在 7.0~8.0 之间酶活力稳定。pH 9.0 时残余酶活力为 50.35%。低浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等对酯酶具有明显的激活作用, 而  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对酶活性影响较小。异辛烷、庚烷、1,4-二氯六环、甲苯、丙酮和 DMF 等有机溶剂也能够促进酶活, 且 EstP8 对异辛烷和庚烷等有机溶剂具有很强的

耐受性, 浓度为 90% 时残余酶活力仍然保持在 50% 以上。因此, EstP8 在有机溶液中催化酯交换作用来改变低价脂肪性能, 生产一些重要的多不饱和脂肪酸及生物柴油工业等方面都具有潜在的应用价值<sup>[25]</sup>。EstP8 与其它低温酯酶学性质的比较见表 6。

表 6 酯酶 EstP8 及其他低温酯酶学性质比较

Table 6 Comparison of EstP8 with other cold-active esterases

酯酶名称	菌株来源	最适底物	最适温度	最适 pH	相对酶活力	参考文献
EstP8	<i>Pseudomonas antitumoralis</i>	C2	50℃	8.0	42% (4℃)	本研究
EstS9N	<i>Pseudomonas</i> sp.	C4	35℃	9.0	40% (10℃)	[26]
Est2349	<i>Thalassospira</i> sp.	C2	45℃	8.5	24% (10℃)	[27]
Est01	Biogas Slurry Metagenomic Library	C4	20℃	8.0	43% (10℃)	[28]
EstC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	C5	35℃	8.5-9	25% (10℃)	[29]
EstTB11	<i>Pseudomonas</i> sp.	短链	25℃	8.5	36% (0℃)	[30]

EstP8 具有高对映选择性水解乙酸苏合香酯的能力, 能够专一性拆分制备手性 (*R*)-1-苯基乙醇。其有效转化率为 39%, *e. e.*<sub>p</sub> 为 78%。低浓度的甲苯、丙酮、异辛烷、正己烷等有机溶剂对 EstP8 的对映选择性具有明显的影响。在 10% 甲苯存在的情况下, *e. e.*<sub>p</sub> 达到 91%; 而在 10% DMSO 存在的情况下, 底物 (*S*)-乙酸苏合香酯的 *e. e.*<sub>s</sub> 达到 98%, 转化率提高至 60%。Liang 等<sup>[31]</sup> 研究的酯酶 BSE01281 在优化后通过水解乙酸苏合香酯制备 (*R*)-1-苯基乙醇的 *e. e.* 可以达到 99%, 但底物 (*S*)-乙酸苏合香酯的 *e. e.* 为 95%, 转化率为 49%。因此 EstP8 在手性化工产品的制备具有重要的潜在应用价值。

综上所述, 酯酶 EstP8 是一种新型的低温微生物酯酶, 具有耐金属离子、耐有机溶剂的特性; 酯酶 EstP8 能通过选择性水解乙酸苏合香酯来制备手性 (*R*)-1-苯基乙醇, 不同有机溶剂的加入可以极大促进该酯酶拆分的光学选择性和产率。本工作所鉴定的酯酶 EstP8 具有良好的产业化应用前景。

### 参考文献

- [1] Zhu Y, Zheng W, Ni H, et al. Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6. *Journal of basic microbiology*, 2015, 55 (10):1219-1231.
- [2] 张敏文, 刘悦, 李荷. 微生物酯酶的研究进展. *广东第二师范学院学报*, 2012, 32(3):66-71.
- Zhang M W, Liu Y, Li H. The Research progress of microbiol

esterase. *Journal of Guangdong University of Education*, 2012, 32 (3):66-71.

- [3] Zhang T, Chen H, Ni Z, et al. Expression and characterization of a new thermostable esterase from *Clostridium thermocellum*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177(7):1437-1446.
- [4] Treichel H, de Oliveira D, Mazutti M A, et al. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 2010, 3(2):182-196.
- [5] Romano D, Bonomi F, de Mattos M C, et al. Esterases as stereoselective biocatalysts. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(5):547-565.
- [6] Vaquero M E, Barriuso J, Martinez M J, et al. Properties, structure, and applications of microbial sterol esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(5):2047-2061.
- [7] Tian X, Zheng G W, Li C-X, et al. Enantioselective production of (*S*)-1-phenyl-1, 2-ethanediol from dicarboxyesters by recombinant *Bacillus subtilis* esterase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73(1-4):80-84.
- [8] 谷耀华, 薛屏, 李鹏, 等. 固定化假单胞菌脂肪酶催化 R-S-3-羟基丁酸乙酯转酯化拆分. *应用化工*, 2015, 44(9):1621-1626.
- Gu Y H, Xue P, Li P, et al. Transesterification resolution of (*R*, *S*)-ethyl-3-hydroxybutyrate catalyzed by immobilized *Pseudomonas* sp lipase. *Applied Chemical Industry*, 2015, 44(9):1621-1626
- [9] 张敏, 贾承胜, 张晓鸣, 等. 脂肪酶催化合成亲水性植物甾醇酯. *中国油脂*, 2015, 40(2):77-80.
- Zhang M, Jia C S, Zhang X M, et al. Lipase-catalyzed synthesis of hydrophilic phytosterol esters. *China Oils and Fats*, 2015, 40(2):

- 77-80.
- [10] Shah Z, Hasan F, Krumholz L, et al. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC MS. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013,77:114-122.
- [11] Lee C, Kim J, Hong S, et al. Cloning, expression, and characterization of a recombinant esterase from cold-adapted *Pseudomonas mandelii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013,169(1):29-40.
- [12] Xu F, Chen S, Xu G, et al. Discovery and expression of a *Pseudomonas* sp. esterase as a novel biocatalyst for the efficient biosynthesis of a chiral intermediate of pregabalin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2015,20(3):473-487.
- [13] Berger R G. Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Current Opinion in Food Science*, 2015,1:38-43.
- [14] Luan Z J, Li F L, Dou S, et al. Substrate channel evolution of an esterase for the synthesis of cilastatin. *Catalysis Science & Technology*, 2015,5(5):2622-2629.
- [15] Novotny C, Erbanova P, Sezimova H, et al. Biodegradation of aromatic-aliphatic copolyesters and polyesteramides by esterase activity-producing microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015,97:25-30.
- [16] Yan Q j, Yang S Q, Duan X J, et al. Characterization of a novel hormone-sensitive lipase family esterase from *Rhizomucor miehei* with tertiary alcohol hydrolysis activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2014,109:76-84.
- [17] Liu Z, Xie J, Shi Y, et al. Isolation of an organophosphorus-degrading strain *Pseudomonas* sp strain YF-5 and cloning of mpd gene from this strain. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2014,8:587-591.
- [18] Kim H J, Jeong Y S, Jung W K, et al. Characterization of novel family IV esterase and family I.3 lipase from an oil-polluted mud flat metagenome. *Mol Biotechnol*, 2015,57(9):781-792.
- [19] Rao L, Xue Y, Zheng Y, et al. A novel alkaliphilic bacillus esterase belongs to the 13(th) bacterial lipolytic enzyme family. *PLoS One*, 2013,8(4):e60645.
- [20] Lopez G, Chow J, Bongon P, et al. A novel thermoalkalostable esterase from *Acidicaldus* sp. strain USBA-GBX-499 with enantioselectivity isolated from an acidic hot springs of Colombian Andes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014,98(20):8603-8616.
- [21] Biver S, Vandenbol M. Characterization of three new carboxylic ester hydrolases isolated by functional screening of a forest soil metagenomic library. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013,40(2):191-200.
- [22] 李冬桂,马丽,刘雄民,等. 生物法拆分-苯乙醇. *应用化学*, 2012,40(2):239-242.
- Li D G, Ma L, Liu X M. Biological resolution of phenylethanol. *Applied Chemical Industry*, 2011,40(2):239-242.
- [23] Liang J, Zhang Y, Sun A, et al. Enantioselective resolution of (+/-)-1-phenylethanol and (+/-)-1-phenylethyl acetate by a novel esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016,178(3):588-595.
- [24] Kumari A, Gupta R. Functional characterisation of novel enantioselective lipase TALipA from *Trichosporon asahii* MSR54: sequence comparison revealed new signature sequence AXSXG among yeast lipases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015,175(1):360-371.
- [25] Su E Z, Zhang J G, Huang M G, et al. Optimization of the lipase-catalyzed irreversible transesterification of *Pistacia chinensis* bunge seed oil for biodiesel production. *Russian Chemical Bulletin*, 2014,63(12):2719-2728.
- [26] Wicka M, Wanarska M, Krajewska E, et al. Cloning, expression, and biochemical characterization of a cold-active GDSL-esterase of a *Pseudomonas* sp S9 isolated from Spitsbergen island soil. *Acta Biochimica Polonica*, 2016,63(1):117-125.
- [27] De Santi C, Leiros H K, Di Scala A, et al. Biochemical characterization and structural analysis of a new cold-active and salt-tolerant esterase from the marine bacterium *Thalassospira* sp. *Extremophiles*, 2016,20(3):323-336.
- [28] Cheng X J, Wang X M, Qiu T L, et al. Molecular cloning and characterization of a novel cold-adapted family VIII esterase from a biogas slurry metagenomic library. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014,24(11):1484-1489.
- [29] Brault G, Shareck F, Hurtubise Y, et al. Isolation and Characterization of EstC, a new cold-active esterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Plos One*, 2012,7(3):e3041.
- [30] Dong J, Zhao W, Gasmalla M A, et al. A novel extracellular cold-active esterase of *Pseudomonas* sp. TB11 from glacier No. 1: Differential induction, purification and characterisation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015,121:53-63.
- [31] Liang J, Zhang Y, Sun A, et al. Enantioselective resolution of (+/-)-1-phenylethanol and (+/-)-1-phenylethyl acetate by a novel esterase from *Bacillus* sp. SCSIO 15121. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016,178(3):558-575.

## Functional Characterization of a Novel Microbial Psychrophilic Lipase and Its Utilization in Stereo-Selective Biocatalysis

GONG Yan-hui<sup>1</sup> MA San-mei<sup>1</sup> ZHANG Yun<sup>2,3</sup> WANG Yong-fei<sup>1</sup> HU Yun-feng<sup>2,3</sup>

(1 Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

(2 Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

(3 Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract** From the genome of *Pseudomonas antitumoralis* HUP007, an esterase gene harboring 1041 bp and encoding a protein EstP8 of 377 amino acid was cloned. Esterase EstP8 was efficiently expressed in *E. coli* BL21(DE3) and further purified. Esterase EstP8 belongs to the IV family of lipases and contains conserved HGGG motif. The optimal substrate of esterase EstP8 was p-NPO, the optimal working temperature of esterase EstP8 was 50°C and the optimal working pH of esterase EstP8 was 8.0. The hydrolysis activity of esterase EstP8 toward p-NPO was 105.19 U/mg, with  $V_{max}$  and  $K_m$  being 89.4  $\mu\text{mol}/\text{min}$  and 1.144 mM, respectively. Esterase EstP8 remained high activity at pH7.0 ~ 8.0. The relative activity of esterase EstP8 was 41.78% at 4°C and esterase EstP8 behaved very good thermo-stability at 10 ~ 40°C. EstP8 exhibited very good resistance to most metal ions tested. The addition of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  or  $\text{Zn}^{2+}$  of low concentrations could even stimulate the activity of EstP8. Organic solvents such as isooctane, methylbenzene, acetone and DMF could stimulate the activity of EstP8. Esterase EstP8 could generate chiral (*R*)-1-phenylethanol through kinetic resolution. The addition of organic solvents could well stimulate the stereo-selectivity and conversion during kinetic resolution. The *e. e.* and conversion of generated (*R*)-1-phenylethanol could reach 91% and 18%, respectively, in the presence of methylbenzene. The *e. e.* and conversion of generated (*S*)-styryl acetate could reach 98% and 60%, respectively, in the presence of DMSO. Psychrophilic esterase EstP8 possesses good potential in diverse industries such as stereo-selective biocatalysis.

**Key words** Psychrophilic esterase Resistance to metal ions Resistance to organic solvents Kinetic resolution High enantio-selectivity