

# 古细菌 *Aeropyrum pernix* K1 超嗜热酯酶 APE1547 的稳定性

解桂秋<sup>1,2</sup>, 高仁钧<sup>1</sup>, 毕云枫<sup>1</sup>, 王中禹<sup>1</sup>, 刘娜<sup>1</sup>, 冯雁<sup>1</sup>, 曹淑桂<sup>1</sup>

(1. 吉林大学分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130023, 2. 吉林大学药学院, 长春 130061)

**摘要** 研究了纯化的超嗜热酯酶 APE1547 的稳定性. 结果表明, 该酶的稳定性非常好, 蛋白的质量浓度为 0.4 mg/mL 时, 90 °C 的半衰期为 20 h, 0.2 mg/mL 时的半衰期为 12 h; 而蛋白的质量浓度为 0.04 mg/mL 时, 保温 2.5 h 时残余活力仍在 50% 以上. 同时还研究了热变性时该酶表面疏水氨基酸的变化. 该酶的 pH 稳定性也很好, pH 在 6.5 ~ 9.0 范围内作用 24 h, 酶依然很稳定, 残余酶活力大于 93%; 同时该酶还具有很强的耐有机溶剂的特性.

**关键词** 古细菌; 超嗜热酯酶; 热稳定性; *Aeropyrum pernix* K1

**中图分类号** O629.8      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2008)01-0109-04

酯酶是一类能催化酯键形成和断开的水解酶, 广泛存在于动植物和微生物中. 由于许多酯酶在水溶液和非水介质中都具有催化活性, 所以是工业生产中应用最为广泛的酶类之一, 可催化立体选择性的水解、转酯和酯合成等反应<sup>[1~3]</sup>. 由于常温下的酶稳定性较差, 通常不能适应如高温、有机溶剂等工业反应条件, 因此提高酶的稳定性是当前生物工程研究的热点之一. 目前主要是通过从高温菌中直接分离耐热酶, 其次是通过蛋白质工程定向改变天然酶分子, 而后者又是以前者的研究为基础的. 耐热酶比之常温酶有很多优点, 对高温、酸、碱、有机溶剂、蛋白变性剂等都有较好的抗性, 克服了常温酶在高温下变性失活的缺点, 同时对耐热酶的结构与功能的研究, 又有助于阐明耐热酶的耐热机制, 为定向改造天然酶提供了理论依据.

耐热酶通常还具有耐有机溶剂及变性剂等特性, 因此更有工业应用的潜力. 耐热酯酶已用于合成生物多聚物, 生产药物、化妆品和香料<sup>[4]</sup>. 目前, 已有十几种来自于嗜热菌及超嗜热菌的嗜热酯酶/脂肪酶被克隆表达, 它们的最适反应温度都在 60 °C 以上, 如来自嗜热细菌(*Alicyclobacillus acidocalarius*) 的嗜热酯酶最适反应温度为 70 °C<sup>[5]</sup>, 来自嗜热古细菌(*Archaeoglobus fulgidus*) 的酯酶最适反应温度为 80 °C<sup>[6]</sup>, 而且都有很好的热稳定性.

我们实验室克隆的来自超嗜热古细菌(*Aeropyrum pernix* K1) 的超嗜热酯酶 APE1547 的最适反应温度为 90 °C<sup>[7]</sup>, 是目前发现的最适反应温度最高的酯酶之一. 本文主要研究该酶的热稳定性、pH 稳定性及有机溶剂稳定性.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

日立 UV-557 紫外-可见分光光度计; 岛津 RF-5301PC 荧光分光光度计.

Nile Red、对硝基苯酚辛酸酯和 Tris 均购自 Sigma 公司; 其余试剂均为国产分析纯.

### 1.2 热稳定性

按照文献[5]的方法, 选择不同质量浓度(0.8, 0.4, 0.2 和 0.04 mg/mL) 的酶置于 30 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液中, 在 90 °C 水浴中保温不同时间, 取样测定残余酶活力. 按照文献[5]的方

收稿日期: 2007-05-16.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30400081, 20432010 和 20672045)资助.

联系人简介: 曹淑桂, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事酶的分子改造和酶催化研究. E-mail: caosg@jlu.edu.cn

法测定热变性时表面疏水氨基酸的变化.

### 1.3 pH 稳定性

将嗜嗜热酯酶 APE1547(终质量浓度 0.1 mg/mL)在不同 pH 的缓冲液中于室温分别放置 1 和 24 h, 测定残余的酶活力.

### 1.4 有机溶剂稳定性

将按文献[8]方法处理过的酶粉溶于 50 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0)中, 于室温放置 4 h, 按标准测活方法测残余活力.

### 1.5 酶活力测定

按照文献[9]的方法, 于 70 °C 用日立 557 型紫外分光光度计测定 405 nm 的光吸收值. 1 个酶活力单位是 1 min 水解底物生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需要的酶量.

## 2 结果与讨论

### 2.1 嗜嗜热酯酶 APE1547 的热稳定性

将不同浓度的嗜嗜热酯酶 APE1547 于 90 °C 保温为一级失活的过程. 表 1 列出了热变性时的速率、半衰期及自由能的变化. 随着蛋白浓度的增加, 热失活的速率常数、半衰期及自由能都随之增加. 热失活的自由能  $\Delta G$  值随着酶浓度的增加而增加, 这预示着对温度敏感形式的酶随着蛋白浓度的增加而减少<sup>[10]</sup>, 酶的浓度越高越稳定. 这说明该酶的热稳定性与酶浓度紧密相关. 酶的质量浓度为 0.2 mg/mL 时, 该酶在 90 °C 的半衰期达到了 12 h.

而来自嗜嗜热细菌(*Alicyclobacillus acidocalarius*)和嗜嗜热古细菌(*Archaeoglobus fulgidus*)的嗜嗜热酯酶在 90 °C 时的半衰期仅为 18 和 28 min<sup>[6,7]</sup>, 表明嗜嗜热酯酶 APE1547 是目前最适反应温度高、热稳定性好的酯酶之一.

为了研究酶在高温下活力与结构之间的关系, 我们考察了酶在 90 °C 热失活时疏水氨基酸的变化. 从图 1(A)可见, 内源荧光的荧光强度随着酶活力的逐渐降低而降低, 在残余酶活力大于 90% 时最大发射波长没有发生移动, 当酶活力损失 20% 以后荧光强度明显降低, 而且最大发射波长发生红移, 从 336 nm 逐渐移到了 345 nm; 从图 1(B)可以看出, 热失活的蛋白与 Nile Red 结合后, 同样在残余酶活力大于 90% 时的荧光强度和最大发射波长都没有发生明显的变化, 而残余酶活力小于 80% 时, 最大发射波长明显蓝移, 从 640 nm(没有结合染料)逐渐移到 590 nm(结合染料的热失活蛋白), 而且荧光强度明显增加.

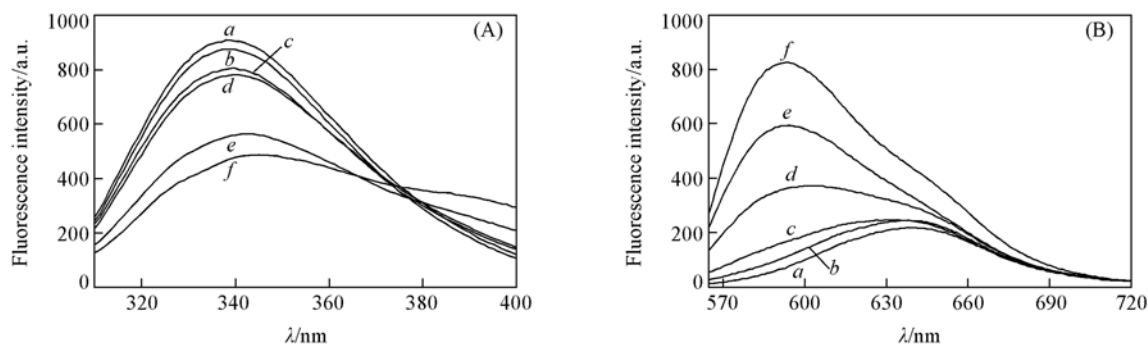


Fig. 1 Accessibility of hydrophobic residues of thermally inactivated hyperthermophilic esterase APE1547

(A) Changes of intrinsic tryptophane fluorescence; (B) determined by Nile Red fluorescence. Residual enzyme activities after thermal inactivation were 100% (a), 93.7% (b), 90% (c), 80% (d), 60% (e), 50% (f), respectively.

Nile Red 在缓冲液中以及在含有蛋白的缓冲液中的最大激发波长一致, 并且荧光强度都很小. 由此可见热失活的进行伴随着疏水氨基酸逐渐地暴露到溶液中. 疏水氨基酸的暴露使蛋白质分子疏水区

容易接触, 并使分子聚集, 导致了超嗜热酯酶 APE1547 失活, 形成的沉淀是不可溶的, 因此热变性失活也是不可逆的。

## 2.2 酶的 pH 稳定性

将 0.2 mg/mL 酶在不同 pH 的缓冲液中于 25 °C 保温, 测定 1 和 24 h 的残余酶活力。结果表明, 该酶在不同 pH 的缓冲液中保温 1 h 后, 酶活力基本未发生变化。保温 24 h 的结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出超嗜热酯酶 APE1547 在酸性条件下不稳定, pH 值为 6.0 范围时, 酶活力损失了 33.3%; 当 pH 值在 6.5 ~ 9.0 范围时, 酶是稳定的, 残余酶活力大于 93%; 当 pH 值在 9.0 ~ 10.0 范围时, 酶也基本上是稳定的。由此可见, 该酶在碱性偏中性 (pH = 6.5 ~ 10) 范围内时, 其稳定性较高, 残余酶活力在 90% 以上。

在低 pH 值下, 酶表面净电荷发生变化, 蛋白分子之间原先的相互排斥作用减弱, 而疏水相互作用加强, 使蛋白质分子大量聚集沉淀是导致蛋白质稳定性下降的主要原因。但是当把溶液的 pH 调回该酶的适合 pH 范围内时沉淀全部消失, 说明 pH 的变化只是改变了酶表面的电荷分布, 使其沉淀, 但该变性过程是可逆的。这也说明了该酶具有高度的 pH 稳定性, 且 pH 的稳定范围较宽。

## 2.3 酶在有机溶剂中的稳定性

有机溶剂对酶活力的影响见表 2。从表 2 可以看出, 强极性溶剂二甲亚砜和甲醇对酶活力的影响较大, 当有机溶剂的  $\lg P$  大于 -0.3 时, 除吡啶外, 酶都保持了很高的活力。通常酶在  $\lg P$  为 1 时已经基本没有活力了, 而超嗜热酯酶 APE1547 在除了上述所提的 3 个有机溶剂外, 剩余活力都在 60% 以上, 显示超嗜热酯酶 APE1547 对有机溶剂有很强的抗性, 比来自筒青霉 (*Penicillium simplicissimum*) 的脂肪酶好得多<sup>[8]</sup>。该酶在与水不互溶的有机溶剂中显示出非常高的稳定性, 有利于有机介质中的酶催化反应。当实际应用时, 选择溶剂体系的过程中可以将  $\lg P$  作为重要的参照条件。

Table 2 Stability of hyperthermophilic esterase APE1547 in organic solvents

Organic solvent	$\lg P$	Relative activity (%)	Organic solvent	$\lg P$	Relative activity (%)
Dimethyl sulfoxide	-2.0300	4	<i>n</i> -Butyl alcohol	0.883	66
Methanol	-0.7139	6	2-Octanol	2.050	100
Ethanol	-0.2799	93	Benzene	2.100	102
Acetone	-0.2400	79	Chloroform	2.200	83
Pyridine	0.6700	18	Cyclohexane	3.440	100
Butylenes oxide	0.4160	88			

## 参 考 文 献

- [1] Kawamoto T., Sonomoto K., Tanaka A. . Biocatalysis[J], 1987, **1**: 137—145
- [2] Klibanov A. M. . Nature[J], 2001, **409**: 241—246
- [3] Bornscheuer U. T. . FEMS Microbiol. Rev. [J], 2002, **26**: 73—81
- [4] Haki G., Rakshit S. K. . Bioresour. Technol. [J], 2003, **89**: 17—34
- [5] Manco G., Adinolfi E., Pisani F., et al. . Biochem. J. [J], 1998, **332**: 203—212
- [6] Manco G., Giosue E., Auria S. D., et al. . Arch. Biochem. Biophys. [J], 2000, **373**: 182—192
- [7] Gao R. J., Feng Y., Ishikawa K., et al. . J. Mol. Cat., B: Enzym. [J], 2003, **24/25**: 1—8
- [8] Sztajer H., Lünsdorf H., Erdmann H., et al. . Biochim. Biophys. Acta[J], 1992, **1124**: 253—261
- [9] Dartois V., Baulard A., Schanck K., et al. . Bioch. Biophys. Acta[J], 1992, **1131**: 253—260
- [10] Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., et al. . Biochim. Biophys. Acta. [J], 1993, **1202**: 207—215

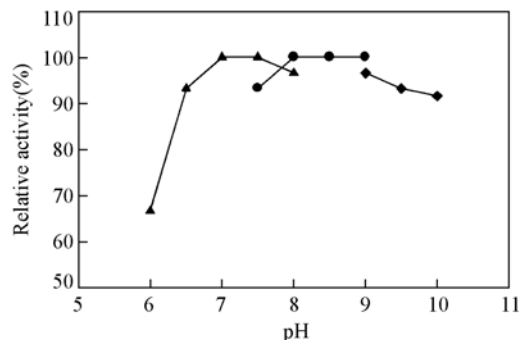


Fig. 2 Effect of pH on stability of hyperthermophilic esterase APE1547

- ▲ H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>B<sub>3</sub>O<sub>7</sub> buffer; ● Phosphate buffer;
- ◆ NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer.

## Stability of a Hyperthermophilic Esterase APE1547 from an Archaeon *Aeropyrum pernix* K1

XIE Gui-Qiu<sup>1,2</sup>, GAO Ren-Jun<sup>1</sup>, BI Yun-Feng<sup>1</sup>, WANG Zhong-Yu<sup>1</sup>, LIU Na<sup>1</sup>,  
FENG Yan<sup>1</sup>, CAO Shu-Gui<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, Ministry of Education,  
Jilin University, Changchun 130023, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130061, China)

**Abstract** The gene APE1547 from an archaeon *Aeropyrum pernix* K1 were cloned and expressed in *E. coli* BL21. The recombinant enzyme shows an esterase activity and its optimum reaction temperature was 90 °C. In this paper, the stability of a hyperthermophilic esterase APE1547 from an archaeon *Aeropyrum pernix* K1 was studied. The experimental results indicate that APE1547 was one of the most stable hyperthermophilic enzymes. Its half-life was 20 h at 90 °C (0.4 mg/mL), and it was stable in an alkaline environment. At the same time, the change of the fluorescence and the activity was detected when the enzyme was thermally denatured. With the exposure of hydrophobic amino acids, its activity reduced gradually. Furthermore, this enzyme has a good pH stability and shows a good organic solvents resistance. The present results indicate that this enzyme will be useful in specific industry process such as high temperature or organic reaction.

**Keywords** Archaeon; Hyperthermophilic esterase; Thermostability; *Aeropyrum pernix* K1

(Ed.: H, J, Z)

### 欢迎订阅《Chemical Research in Chinese Universities》

《Chemical Research in Chinese Universities》(《高等学校化学研究》, 英文版, 双月刊)是中华人民共和国教育部委托吉林大学主办的化学学科综合性学术刊物, 1984年创刊。本刊以研究论文、研究快报、研究简报和综合评述等栏目集中报道我国高等院校和中国科学院各研究所在化学学科及其交叉学科、新兴学科、边缘学科等领域所开展的基础研究、应用研究和重大开发研究所取得的最新成果。

本刊由中华人民共和国教育部从全国重点高等院校和中国科学院聘请81位学术造诣精深的化学家组成学术阵容强大的编委会, 由著名理论化学家唐敖庆院士任名誉主编, 著名高分子化学家周其凤院士任主编。

本刊以“新、快、高”(即选题内容新, 文章发表速度快和学术水平及编辑出版质量高)为办刊特色, 刊载国家自然科学基金、攀登计划、“八六三”和“九七三”计划资助项目及其它科学基金资助项目成果文章达90%以上。从1992年起先后被美国科技信息研究所(ISI)的数据库和《SCI Expanded》、《SCI Search》、《Research Alert》、《Chemistry Citation Index》等检索刊物所收录, 从1999年起被《Current Contents/Physical, Chemical & Earth Science》收录, 据美国科技信息研究所期刊引证报告(JCR)公布的文献计量学数据, 本刊影响因子2001年为0.223, 2002年为0.229, 2003年为0.370, 2004年为0.538, 2005年为0.411。刊文长期被《中国化学化工文摘》、美国《化学文摘》(C.A.)、美国《EI, Compendex》、俄罗斯《文摘杂志》(P. Ж.)和日本《科技文献速报》等中外著名检索刊物和文献数据库摘引和收录。

本刊1992年荣获国家教委直属高校优秀科技期刊奖, 1997年荣获国家教委系统优秀科技期刊二等奖, 1999年荣获国家教育部全国高等学校自然科学学报及教育部优秀科技期刊一等奖(等同于教育部科技进步一等奖), 2004年荣获全国高校优秀科技期刊二等奖, 2006年荣获首届中国高校精品科技期刊称号。《Chemical Research in Chinese Universities》于2004年由季刊扩为双月刊, 16开本(A4), 每期128页, 采用微机排版, 激光照排, 铜版纸印刷, 装帧质量高。国内定价30元/期(180元/年), 国内外公开发行, 国际刊号ISSN 1005-9040, 国内刊号CN 22-1183/06, 邮发代号12-170。国内读者可在当地邮局订阅, 国外读者可通过中国国际图书贸易总公司(国外发行代号: 1533BM)订阅。补订者可与本刊编辑部联系。

2006年开始与Elsevier公司合作出版发行网络版(<http://www.sciencedirect.com>)。

通讯地址: 长春市吉林大学前卫校区北区《高等学校化学学报》编辑部(邮政编码: 130021); 电话: 0431-88499216, 88499867, 88499870; 传真: 0431-88925344; E-mail: [cjcu@jlu.edu.cn](mailto:cjcu@jlu.edu.cn); <http://www.cjcu.jlu.edu.cn>