

文章编号:1673-1689(2006)04-0121-06

细菌脂肪酶的结构和功能研究进展

闫云君*, 舒正玉*, 杨江科

(华中科技大学 生命科学技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要: 细菌脂肪酶是一类广泛应用于工业领域的生物催化剂,具有重要的应用价值。迄今为止,已有 7 个细菌脂肪酶的三维结构被阐明,30 个细菌脂肪酶的基因序列被测定和分析。作者综述了细菌脂肪酶的分子结构、分泌和折叠过程及其催化机制。

关键词: 脂肪酶;分子结构;分泌过程;折叠机制;催化机制

中图分类号:Q 5,Q 7

文献标识码:A

Advances in the Study of the Molecular Structure and Function of the Bacterial Lipase

YAN Yun-Jun*, SHU Zheng-Yu*, YANG Jiang-Ke

(College of Life Science and Technology, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430074, China)

Abstract: Bacterial lipase is a kind of biocatalyst which is widely used in many industrial fields. Up to now, more than seven 3-dimensional structures of the bacterial lipase have been elucidated and thirty bacterial lipase DNA sequences were determined. In this review paper, discussion is focused on the 3D-structure, the process of the secretion and folding and the catalytic mechanism of the bacterial lipase.

Key words: lipase; molecular structure; secretion procedure; folding process; catalytic mechanism

微生物脂肪酶(lipase, EC 3. 1. 1. 3, 甘油三酯水解酶)是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸的酶类(或者是此反应的逆反应)^[1]。许多微生物脂肪酶还能催化酯化反应、酯交换反应、醇解反应、酸解反应以及氨解反应等^[2-3]。微生物脂肪酶具有界面激活(interfacial activation)的催化特点。结构上,绝大多数微生物脂肪酶有一个盖子结构(lid),覆盖在脂肪酶活性中心的上方^[4]。

微生物脂肪酶资源丰富,具有在有机溶剂中稳定性好、广泛的底物特异性、高度的位置选择性(regioselectivity)和异构体选择性(enantioselectivity)、催化活性高而副反应少等特点^[1],因此被广泛应用于食品加工、新型生物材料、生物传感器、生物医学等领域^[1-2,5]。一些细菌脂肪酶在极端环境(如高温、低温等)下仍能保持良好的生物催化活性,引起人们的特别关注。作者就细菌脂肪酶的分子结构、分泌和折叠过程及其催化机制等进行综述。

收稿日期:2006-05-08; 修回日期:2006-06-07.

基金项目:国家“863”计划项目(2003AA214061).

作者简介:闫云君(1969-),男,湖北黄冈人,教授,博士研究生导师;* 通讯作者.

1 细菌脂肪酶的分子结构

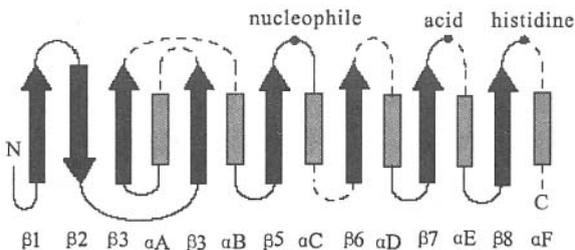
1.1 细菌脂肪酶的氨基酸序列比较

Jaeger^[4-5]和 Arpigny^[6]比较了22种不同细菌脂肪酶的氨基酸序列,并根据这些细菌脂肪酶氨基酸序列同源性的、保守序列的模体差异以及脂肪酶生物学性质的不同,将细菌脂肪酶分为假单胞菌脂肪酶(*Pseudomonas lipase*)、葡萄球菌脂肪酶(*Staphylococcus lipase*)、芽胞杆菌脂肪酶(*Bacillus lipase*)等6大类。

除了构成脂肪酶活性中心的催化三联体氨基酸序列高度保守外,不同类群的细菌脂肪酶氨基酸序列之间同源性比较小,仅在少数区域存在一定的保守序列,如第四条链N-末端一般含有能形成阴离子氧洞(oxyanion hole)的氨基酸残基;第五条链上活性位点Ser残基附近的序列(Ser残基后可形成 α -螺旋结构的序列);活性位点Asp和His残基附近的序列等^[7]。

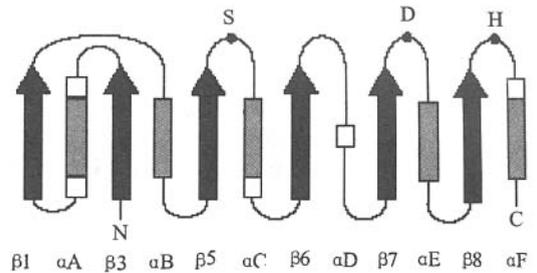
1.2 细菌脂肪酶的二级结构

尽管不同来源的细菌脂肪酶在分子大小、水解底物的特异性、氨基酸序列上差异较大,但是其空间结构却非常相似,都具有相似的折叠方式—— α/β 水解酶折叠。 α/β 水解酶折叠是由8个平行的 β 折叠片($\beta 1 \sim \beta 8$)组成一个中心(第二个 β 折叠片为反平行排列)。从第三个到第八个 β 折叠片之间分别有 α 螺旋相连($\alpha A \sim \alpha F$),排列在 β 折叠片的两侧。 β 折叠片左手超螺旋扭曲,导致 $\beta 1$ 和 $\beta 8$ 在空间上以近于 90° 的夹角相互交叉。 α/β 水解酶折叠结构为各种脂肪酶的活性位点提供了一个稳定的支架:催化三联体中携带有亲核基团的Ser残基,一般位于 $\beta 5$ 链后面;酸性氨基酸(Asp或Glu)残基一般位于 $\beta 7$ 链后面;而His残基一般位于最后一个 β 链的后面(见图1a)^[8]。不同细菌脂肪酶二级结构的差别主要表现在 β 折叠片和 α 螺旋数量、 β 折叠片扭曲的角度、 α 螺旋的空间分布位置等的差异(见图1b,c,d)。

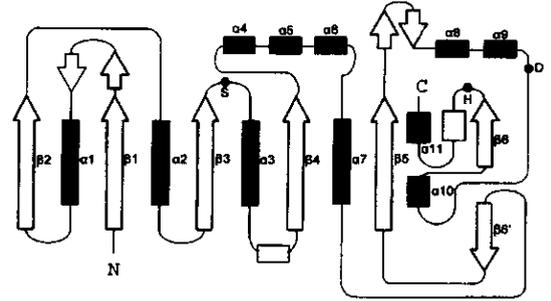


(a)

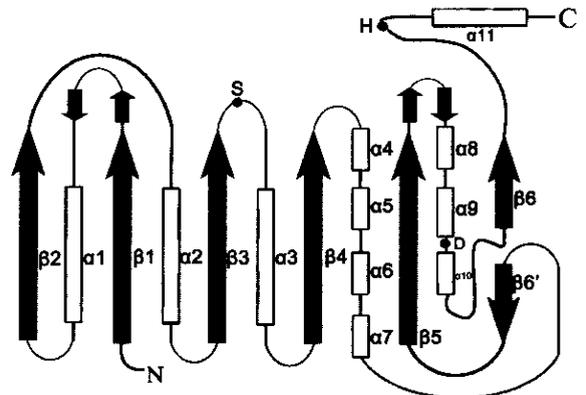
万方数据



(b)



(c)



(d)

(a)典型的 α/β 水解酶折叠^[9];(b)*Bacillus subtilis* 脂肪酶二级结构^[9];(c)*Pseudomonas cepacia* 脂肪酶二级结构^[10];(d)*Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 脂肪酶二级结构^[11]

图1 不同细菌脂肪酶的 α/β 水解酶二级结构比较

Fig. 1 The difference of the secondary structure topology of the bacterial lipases

1.3 细菌脂肪酶的三级结构

自1990年第一个微生物脂肪酶——*Rhizomucor miehei* 脂肪酶的三维结构被测定以来,已有超过16个微生物脂肪酶的三维结构被阐明(检索<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>; <http://www.led.uni-stuttgart.de>; <http://www.au-kbc.org,05/07/2006>),其中7个是细菌脂肪酶。所有已测定三维结构的细菌脂肪酶均是由位于酶中央的 β 折叠和包围在 β 折叠外面的 α 螺旋构成的近似球形的蛋白质分子,相对分子质量为19 000~60 000。活性中心由Ser、Asp(或Glu)和His 3个残基组成催化三联体,Ser残基一般位于 $\beta 5$ 链C末端高度保守的五肽GXSXG中(X代表任意氨基酸残基,Ba-

cillus 保守五肽的第一个 Gly 残基被 Ala 残基代替),形成 β 转角- α 螺旋模体。构成脂肪酶活性中心的氨基酸残基并不直接暴露到溶剂当中,而是通过一个狭窄的缝隙同酶分子表面相连。在酶分子表面有一段 α 螺旋形成“盖子结构”覆盖在活性中心的上方。在活性中心附近,脂肪酶有一个 Ca^{2+} 结合位点。 Ca^{2+} 分别与脂肪酶主链上的 4 个羧基氧原子和 2 个水分子相互作用,形成一个稳定的八面体,有助于脂肪酶的激活和酶结构的稳定,但 Ca^{2+} 并不参与脂肪酶的催化作用(见图 2)。与 Ca^{2+} 相互作用的 4 个羧基氧原子中有一个是以顺式肽键(cis-peptide bond)的形式存在,顺式肽键通过周围的氢键网络(hydrogen bonding network)维持其结构稳定。*Pseudomonas cepacia* 脂肪酶在激活状态下,还通过主链上的酰胺基氮原子(Leu17 和 Glu88)形成一个阴离子氧洞(oxyanion hole),以稳定脂肪酶催化过程中形成的四面体中间复合物(tetrahedral intermediate)^[1,7,10-11]。图中箭头代表 β 链,卷曲结构代表 α 螺旋,小圆球代表潜在的 Ca^{2+} 结合位点,右上角的 α 螺旋形成盖子结构覆盖在活性中心上面。

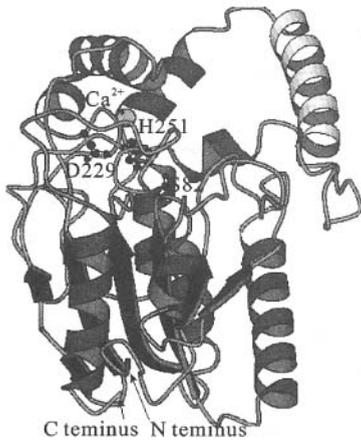


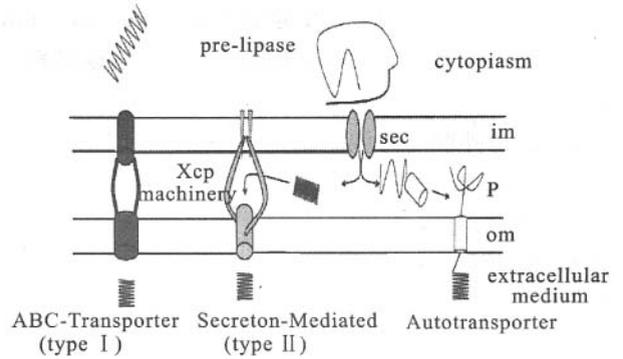
图 2 *Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶 X-衍射三维结构图

Fig. 2 The 3D-structure of the lipase from *Pseudomonas aeruginosa* using the X-ray coordinates determined

2 细菌脂肪酶的分泌

所有已知的细菌脂肪酶都是胞外酶,因此细胞内合成的脂肪酶在其分泌过程中,必须通过细胞膜进行转运,依次通过质膜(cytoplasmic membrane, 革兰氏阳性细菌)、周质间隙和外膜(periplasm and outer membrane)(革兰氏阴性细菌)。不同细菌通常采用不同的分泌机制(见图 3);同一种细菌(如

Bacillus subtilis)也可以采用不同的分泌系统分泌具有高度同源的脂肪酶(Lip A 和 Lip B)^[12]。



im(inner membrane, 内膜), om(outer membrane, 外膜), P(periplasm, 周质间隙)

图 3 不同细菌脂肪酶分泌途径示意图^[13]

Fig. 3 The schematic diagram of the secretion pathways used by lipases of the different bacteria

2.1 ABC 转运系统(ABC exporter)

ABC(ATP-binding cassette)转运系统又称为 I 型分泌途径,是由 3 种细胞包膜蛋白(envelope protein)构成:内膜 ATP 酶(ATPase)、膜融合蛋白(membrane-fusion-protein, MFP)和外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)。内膜 ATP 酶具有底物特异性;MFP 蛋白通过一个面向周质间隙的大亲水基团锚定在内膜上,而 C-末端的结构域与外膜结合。该转运复合物能促进内膜与外膜之间形成一个粘着位点,继而形成一个横越周质间隙的管孔。脂肪酶通过管孔直接分泌到细胞外的基质中,而无需在周质间隙形成具有酶学活性的中间体(图 3)。采用这种途径分泌的脂肪酶如 *Pseudomonas fluorescens* 脂肪酶和 *Serratia marcescens* 脂肪酶, N-末端均缺乏相应的信号肽,而 C-末端却均包含相应的靶信号(targeting signal)(*Serratia. marcescens* 脂肪酶 C-末端的靶信号为 Val-Ala-Leu)。该靶信号及靶信号与 C-末端的相对距离直接影响到脂肪酶的分泌^[5,12]。采用基因工程技术在 *Pseudomonas. fluorescens* 中大量表达多拷贝的 ABC 转运基因,可显著提高脂肪酶的分泌量^[14]。

2.2 通过内膜的分泌

大多数细菌采用 II 型分泌途径分泌脂肪酶。采用 II 型分泌途径的细菌脂肪酶通过内膜分泌到周质间隙的过程主要是在 Sec-移位酶(Sec translocase)的作用下完成的(图 3)。Sec-移位酶是一个多亚基的蛋白质复合体,由一个可溶性的 SecA 二聚体和 5 个嵌入细胞内膜的亚基 SecY, E, D, G, F 组成。*Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶 N-末端的信号肽序列,作为 Sec-移位酶的潜在底物,同 Sec-移位

酶相互作用,从而指导脂肪酶的转运^[12]。而 *Bacillus subtilis* 脂肪酶 LipA N-末端的信号序列中包含有一个独特的成对精氨酸运输模体(Twin arginine translocation motif),指导 LipA 通过 *Tat* 途径跨膜转运^[13]。

2.3 通过外膜的分泌

革兰氏阴性细菌脂肪酶通过内膜后,还要在周质间隙中折叠成具有酶学活性的构象,才能采用相应的分泌途径通过细胞外膜。

2.3.1 自动转运蛋白(Autotransporter)介导的分泌 自动转运蛋白是一个由 14 个 β 折叠片构成的 β -桶状结构,插入细胞外膜,形成一个孔状通道(见图 3)。脂肪酶 C-末端的结构域与自动转运蛋白具有高度的同源性,在自动转运蛋白的介导下,脂肪酶通过孔状通道,直接分泌到细菌细胞的表面^[15]。

2.3.2 分泌子(secreton)介导的分泌 分泌子介导的分泌途径即为通常所说的 II 型分泌途径。分泌子是由定位在内膜上的 12 种不同 Xcp 蛋白质亚基组成的多亚基复合体,其中 XcpQ 蛋白在外膜上形成了一个直径为 9.5 nm 的孔状通道^[16](见图 3)。*Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶就是采用这种分泌途径分泌到细胞外的基质中。增加分泌子在菌体内的拷贝数,*Pseudomonas alcaligenes* 细胞外脂肪酶的分泌量可显著增加^[17]。

3 细菌脂肪酶的折叠

采用 I 型分泌途径分泌的脂肪酶在细胞内合成后,其 C 末端以未折叠的松散形式存在,并继续以这种形式通过细胞内膜和外膜,分泌到细胞外的基质中。直到 C 末端的结构域同基质中的 Ca^{2+} 结合后,在 Ca^{2+} 离子的诱导下,脂肪酶才折叠成具有酶学活性的构象^[18]。

而采用 II 型分泌途径分泌的脂肪酶只有在周质间隙中折叠成具有分泌能力的分子构象后,才能进一步分泌到细胞外的基质中。错误折叠的脂肪酶将被周质间隙的蛋白酶所降解。脂肪酶的折叠过程,是在 Lif 蛋白和 Dsb 蛋白的共同参与下完成的(见图 4)。

Lif(Lipase-specific foldases)蛋白是一种特殊的分子间折叠催化剂,由 N-末端的跨膜疏水结构域、C-末端的结构域和两者之间的一段具有高度可变性且富含脯氨酸和丙氨酸的区域三部分组成。N-末端结构域将 Lif 蛋白锚定在内膜上,阻止 Lif 蛋白与脂肪酶以复合物的形式分泌到细菌的周质间隙中;而突出于周质间隙中的 C 末端结构域决定

了 Lif 蛋白与对应的同源脂肪酶之间的特异性,是与脂肪酶作用的功能性结构域。作为脂肪酶的空间分子伴侣(steric chaperone),Lif 蛋白与脂肪酶形成一个稳定的复合物,降低脂肪酶的自由能,帮助脂肪酶克服折叠途径中的能量障碍,提供脂肪酶折叠成有酶学活性构象所需的空信息。提高 *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Burkholderia glumae* 菌体细胞内 Lif 蛋白的表达水平,胞外脂肪酶的产生显著增加^[19]。脂肪酶分泌时,Lif 蛋白将与脂肪酶分离开来,参与下一个同源脂肪酶的折叠催化。因此,Lif 蛋白又是一个多通量的(multiturnover)催化剂。周质间隙中的 Lif 蛋白是否直接参与了脂肪酶的分泌以及是否还作为脂肪酶的抑制剂阻止脂肪酶在周质间隙中发挥催化活性,还有待进一步深入研究。

有些分泌到细胞外的脂肪酶在周质间隙中还需要 Dsb 蛋白催化形成二硫键。其中,二硫化物氧化还原酶 DsbA 氧化半胱氨酸的巯基形成二硫键;而二硫化物异构酶 DsbC 异构化被错误氧化的二硫键。脂肪酶分子内二硫键的形成提高了脂肪酶对温度、尿素、蛋白质水解酶等变性剂的稳定性^[12,19-21]。

此外,El Khattabi^[19]和 Shibata^[22]报导 Ca^{2+} 参与了 *Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶的折叠。用 EDTA 螯合 Ca^{2+} 后,折叠的脂肪酶将变成松散状态,同时,脂肪酶也将失去生物催化活性。

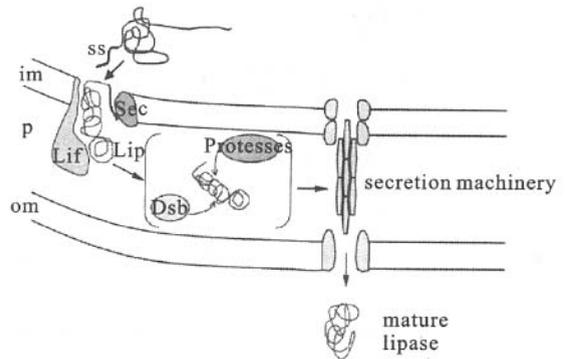


图 4 II 型分泌途径分泌的细菌脂肪酶在周质间隙的折叠过程及其分泌机制示意图^[12]

Fig. 4 The secretion and folding process of the bacterial lipases mediated by the type II secretion pathway in periplasmic space

4 细菌脂肪酶的催化机理

细菌脂肪酶活性中心具有与丝氨酸蛋白酶相似的催化三联体,其催化机制也与丝氨酸蛋白酶十分相似。Jaeger^[4,7]将羧基酯键的水解断裂过程分

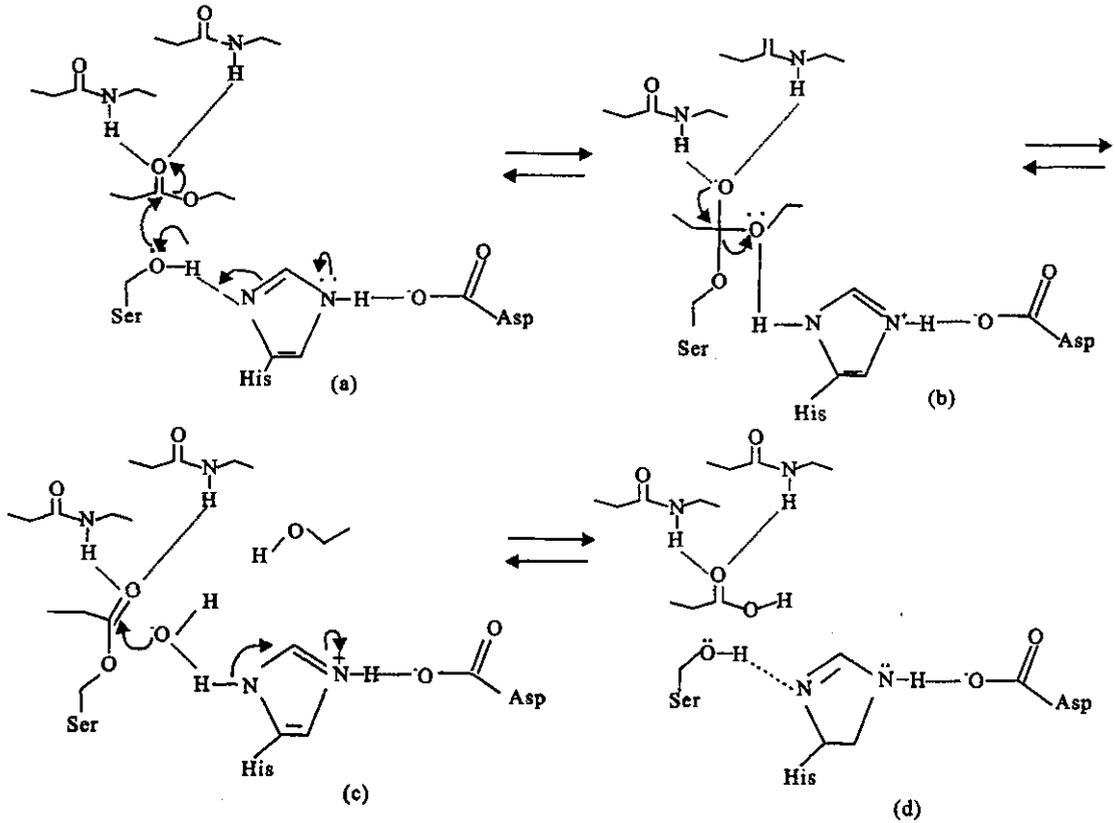
图5 细菌脂肪酶的催化机制^[4]

Fig. 5 Reaction mechanism of bacterial lipases

为4个阶段。

4.1 酶与底物的结合

除了 *Pseudomonas aeruginosa* 脂肪酶、*Bacillus subtilis* 脂肪酶等少数几种细菌脂肪酶外,绝大多数细菌脂肪酶均具有界面激活的特性。界面激活是由于脂肪酶活性中心区域结构重排的结果。当没有油水界面时,脂肪酶的活性中心被盖子结构覆盖,脂肪酶呈一种闭合型结构。一旦环境中有疏水性物质存在时,盖子结构疏水一侧暴露到脂相中,增强了酶与脂表面的疏水作用,盖子结构打开^[23],脂肪酶露出一个大的疏水表面^[24],底物与活性中心的催化残基结合。在活性中心附近的组氨酸的参与下,活性中心的丝氨酸残基被激活,丝氨酸残基基上的氢原子转移到组氨酸的咪唑环上,丝氨酸残基的羟基氧原子对已被激活的底物羰基碳原子发起亲核攻击见图5(a)。

4.2 四面体中间复合物的形成

在丝氨酸残基羟基氧原子的作用下,羰基双键断裂,羰基氧原子携带上负电荷(阴离子氧),而羰基碳原子与4个其它原子键合,形成一个瞬间的四面体中间复合物,见图5(b)。阴离子氧通过与两个肽键的-NH-基团相互作用而稳定;醇羟基的氧原子通过与组氨酸提供的质子氢相互作用而稳定。

4.3 酰基-酶共价中间体复合物的形成

羰基碳原子继而发生螺旋扭转,形成一个螺旋状的大偶极,阴离子氧与另外两个肽键的-NH-基之间形成氢键(阴离子氧洞)。而组氨酸咪唑环上从丝氨酸羟基获得的质子氢被转移给酯键的醇羟基,酯键断裂,释放游离的醇,同时羰基与质子化的丝氨酸之间重新形成酯键。这样,就形成了一个稳定的酰基-酶共价中间体复合物,见图5(c)。

4.4 脱酰基过程

组氨酸残基的咪唑环将从丝氨酸获得的质子转移给酯键的醇羟基后,又从进入活性中心的水分子中夺取质子,从而激活了水分子。水分子剩下的OH⁻离子攻击同丝氨酸羟基共价结合的底物羰基的碳原子,同时组氨酸再次将从水分子中获得的质子转移给丝氨酸的阴离子氧,释放游离的羧基化合物,见图5(d)。

Petersen^[25]研究了9种不同脂肪酶(酯酶)分子表面的电荷与脂肪酶(酯酶)活力的关系,解释了脂肪酶分子表面的静电电位在脂肪酶催化中的作用,提出了“静电弹射模型”(electrostatic catapult model)的水解产物释放新机制。

参考文献:

- [1] Jaeger Karl-Erich, Reetz Manfred T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology[J]. **Trends in Biotechnology**, 1998, 16(9): 396—403.
- [2] Pandey Ashok, Benjamin Sailas, Soccol Carlos R, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology[J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 1999, 29: 191—131.
- [3] Davis Benjamin G, Boyer Viviane. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis[J]. **Nat Prod Rep**, 2001, 18: 618—640.
- [4] Jaeger K-E, Dijkstra B W, Reetz M T. Bacterial biocatalysis; Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases[J]. **Annual Review of Microbiology**, 1999, 53(1): 315—351.
- [5] Jaeger Karl-Erich, Eggert Thorsten. Lipases for biotechnology[J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2002, 13(4): 390—397.
- [6] Arpigny Jean Louis, Jaeger Karl-Erich. Bacterial lipolytic enzymes; classification and properties[J]. **Biochem J**, 1999, 343: 177—183.
- [7] Jaeger Karl-Erich, Ransac Stéphane, Dijkstra Bauke W, et al. Bacterial lipases[J]. **Microbiology Reviews**, 1994, 15(1): 29—63.
- [8] Nardini Marco, Dijkstra Bauke W. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing[J]. **Current Opinion in Structural Biology**, 1999, 9(6): 732—737.
- [9] Pouderoyen Gertie van, Eggert Thorsten, Jaeger Karl-Erich. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase; a minimal α/β hydrolase fold enzyme[J]. **J Mol Biol**, 2001, 309: 215—226.
- [10] Kim Kyeong Kyu, Song Hyun Kyu, Shin Dong Hae. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor[J]. **Structure**, 1997, 5(2): 173—185.
- [11] Lang D, Hofmann B, Haalck L, et al. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 Å resolution[J]. **J Mol Biol**, 1996, 259(4): 704—717.
- [12] Rosenau Frank, Jaeger Karl-Erich. Bacterial lipases from *Pseudomonas*; regulation of gene expression and mechanisms of secretion[J]. **Biochimie**, 2000, 82(11): 1023—1032.
- [13] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome[J]. **Microbiol Mol Biol Rev**, 2000, 64: 515—547.
- [14] Ahn J H, Pan J G, Rhee J S. Homologous expression of the lipase and ABC transporter gene cluster, tliDEFA, enhances lipase secretion in *Pseudomonas* spp[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67: 5506—5511.
- [15] Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger K. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. **J Bacteriol**, 1999, 181: 6977—6986.
- [16] Brok Ronald, Van Gelder Patrick, Winterhalter Mathias, et al. The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity[J]. **Journal of Molecular Biology**, 1999, 294(5): 1169—1179.
- [17] Gerritse Gijs, Ure Roisin, Bizoullier Fanny. 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.
- [18] Amada Kei, Kwon Hyun-Ju, Haruki Mitsuru. Ca^{2+} -induced folding of a family I.3 lipase with repetitive Ca^{2+} binding motifs at the C-terminus[J]. **FEBS Letters**, 2001, 509(1): 17—21.
- [19] El Khattabi Mohamed, Van Gelder Patrick, Bitter Wilbert. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2003, 22(5—6): 329—338.
- [20] El Khattabi M, Oekhuijsen C, Bitter W. Specificity of the lipase-specific foldases of gram-negative bacteria and the role of the membrane anchor[J]. **Mol Gen Genet**, 1999, 261: 770—776.
- [21] Rosenau Frank, Tommassen Jan, Jaeger Karl-Erich. Lipase-specific foldases[J]. **Chem Bio Chem**, 2004, 5: 152—161.
- [22] Shibata H, Kato H, Oda J. Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB[J]. **J Biochem**, 1998, 123(1): 136—141.
- [23] Danielsen Steffen, Eklund Malin, Deussen Heinz-Josef, et al. In vitro selection of enzymatically active lipase variants from phage libraries using a mechanism-based inhibitor[J]. **Gene**, 2001, 272: 267—274.
- [24] Svendsen Allan. Lipase protein engineering[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2000, 1543(2): 223—238.
- [25] Petersen Maria, Teresa Neves, Fojan Peter. How do lipases and esterases work; the electrostatic contribution[J]. **Journal of Biotechnology**, 2001, 85: 115—147.