

源自活性污泥多源基因體新穎酯酶 Est03 之蛋白純化與特性分析⁽¹⁾

黃子瑄⁽²⁾ 廖仁寶⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：110 年 5 月 24 日；接受日期：111 年 1 月 19 日

摘 要

本研究目的為針對從活性污泥多源基因體篩選而得的新穎酯酶基因 *est03* 進行次選殖、表現、純化及特性分析，以期供後續研究與應用。*est03* 基因長 762 bp，可轉譯為含 253 個胺基酸的酯酶，分子大小約為 28.8 kDa，稱為 Est03。將新穎酯酶基因 *est03* 次選殖於表現載體 pPAL7 上，轉形於表現宿主大腸桿菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE3)) 中。轉形株經 IPTG 誘導大量表現標的蛋白質後，利用套組純化並切除後成為與原始胺基酸序列相同的純化酵素。經特性分析後發現，Est03 對於短鏈脂肪酸受質有較高喜好度，尤其對二碳受質 (C2) 活性顯著高於其他 ($P < 0.001$)，在溫度試驗中顯示它在 35 – 50°C 具有較佳活性，最適溫度為 45°C，比活性為 12.15 unit/mg， k_{cat}/K_m 為 $1.58 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 。Est03 在 pH 6.5 至 pH 9.0 間，相較於在其他 pH 值有較佳活性，且於 pH 8.0 時活性最高。同時，Est03 在常用種類與濃度之有機溶劑、金屬離子及介面活性劑環境中皆具有活性。綜而論之，Est03 具有值得關注的生化特性，期能進一步開發應用於生物技術產業。

關鍵詞：活性污泥多源基因體、新穎酯酶、特性分析。

緒 言

生物催化劑 (biocatalysts) 可取代傳統的化學物質，具有低價、減少有害化合物、高效率高製程表現與增進產率等特性，使全球產業對於新穎生物酵素之需求逐年增加 (Berini *et al.*, 2017)。解脂酶 (lipolytic enzymes) 是普遍存在的 α/β 水解酶，存在於動物、植物和微生物中，包含酯酶 (esterases, EC3.1.1.1) 及脂肪酶 (lipases, EC3.1.1.3) (Arpigny and Jaeger, 1999)。脂肪酶可定義為可合成及水解 C_{10} 以上的長鏈三酸甘油酯 (long-chain triglycerides)；羧酸酯酶 (carboxylesterase) 則可合成及水解 C_{10} 以下之短鏈三酸甘油酯 (Verger, 1997)。由於微生物酵素具有較廣泛的受質專一性與在有機溶劑中之穩定性，微生物來源之解脂酶被廣泛用於工業生物技術，如精細化學品與藥物生產 (Straathof *et al.*, 2002) 及食品工業 (Raveendran *et al.*, 2018)。

廢水處理廠藉由微生物處理移除廢水中大部分的有機物，具有高酵素活性 (enzymatic activities) (Molina-Muñoz *et al.*, 2010)。臺灣地區養豬廢水大多以三段式廢水處理系統進行降解，分別為固液分離 (solid-liquid separation)、厭氧消化 (anaerobic digestion) 及好氧消化 (aerobic digestion)，其中好氧活性污泥能夠快速降解大量有機物，藉由微生物酵素活性作用降低放流水之化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 及生物需氧量 (biological oxygen demand, BOD)，因此活性污泥中的微生物是相當值得探索的生物資源寶庫，但研究估計活性污泥中 85 – 99% 之微生物無法或難以進行培養 (Amann *et al.*, 1995)。因此直接利用生物技術進行微生物的基因選殖、重組與純化蛋白是個可行的方向。

近年來生物技術之發展，使用多源基因庫 (metagenomics libraries) 技術可大量篩選基因庫 (gene pool) 中之新穎基因片段及了解相關資訊，不受限於可培養之微生物 (Uchiyama *et al.*, 2009)。在先前的研究中，直接自活性污泥樣本中萃取 DNA，將平均約 5.1 kb 之基因片段插入於質體系統，並轉形於宿主細胞大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之中，以形成基因庫。在約 3,818 個株系 (clones) 中，顯示 12 個株系具有三丁酸甘油酯 (tributyrin) 分解活性，透過 DNA 定

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2692 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 通訊作者，E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw。

序與序列分析則發現了 16 個預測為解脂基因的開放閱讀框 (open reading frames, ORFs)。由其胺基酸序列與現有蛋白質資料庫比對結果相同度為低到中等 (28 – 55%)。其中 Lipo3 以系統發生學分析 (phylogenetic analysis) 顯示其為解脂酶第五家族 (family V) (Liaw *et al.*, 2010)。第五家族解脂酶可在許多中溫 (mesophilic)、嗜溫 (psychrophilic)、嗜熱 (thermophilic) 及鹽耐受 (salt tolerance) 細菌 (Arpigny and Jaeger, 1999) 中找到，具有多樣的受質專一性及特性，而這些細菌源自於反芻動物瘤胃 (Privé *et al.*, 2013)、土壤 (Chen *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Istvan *et al.*, 2018)、釀酒發酵 (Sumby *et al.*, 2013) 及深海沉澱物 (Peng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018)。因此，本研究針對 Lipo3 ORF 進行次選殖，並將此基因命名為 *est03*，進行表現、純化及特性分析，以瞭解此新穎酯酶的相關生化性質，並期可應用於相關產業。

材料與方法

I. *est03* 酯酶基因表現載體建構

依據先前從活性污泥建構多源基因庫篩得具解脂活性的株系 ASL03 (Liaw *et al.*, 2010)，進行標的 Lipo3 ORF 之次選殖，並命名此基因為 *est03*。設計引子對 Est03F7：5'-CCAAGCTTTGATGGATATTTTTTCGAATGA-3' 與 Est03R7：5'-CCCTCGAGTTAAACTAAAAATTCCATGGTC-3'，粗斜體分別為限制酶 *Hind*III 與 *Xho*I 辨識與分切序列。PCR 組成分總體積為 50 μ L，含 *miliQ* 水 40.5 μ L、10 \times *PfuUltra* II reaction buffer (Stratagene, USA) 5.0 μ L、dNTP mix (25 mM each dNTP, TaKaRa, Japan) 0.5 μ L、模板 DNA (pASL03、100 ng/ μ L) 1.0 μ L、Est03F7 (10 μ M) 1.0 μ L、Est03R7 (10 μ M) 1.0 μ L、*PfuUltra* II fusion HS DNA polymerase (Stratagene, USA) 1.0 μ L。PCR 條件為預變性 94 $^{\circ}$ C、5 min；循環增幅 35 次循環：變性 95 $^{\circ}$ C、30 s，黏合 58 $^{\circ}$ C、30 s，延長 72 $^{\circ}$ C、15 s，後延長 72 $^{\circ}$ C、10 min。PCR 反應增幅標的基因片段純化後，經限制酶 *Hind*III 與 *Xho*I 作用，再接合於經 *Hind*III 與 *Xho*I 處理之表現載體上 (pPAL7, BioRad, USA)，轉形於宿主細胞 *Escherichia coli* DH5 α (ECOSTM X, Yeastern Biotech Co., Ltd., Taiwan)。隨機挑選轉形株 (transformant) 於 LB 培養液 (Luria-Bertani (LB) broth, Difco, USA)，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 過夜培養後，利用萃取試劑組 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Germany) 所提供之操作方法，進行質體 DNA 分離純化，利用 Sanger 定序法，以 DNA 定序儀 (ABI 3730 DNA Sequencer, Applied Biosystems, USA) 定序，再以軟體 Vector NTI Advance 11.5.0 (Invitrogen, USA) 處理與比對序列，以確認構築重組質體插入片段序列正確性。

II. Est03 酯酶分子分析

利用軟體 Vector NTI Advance 11.5.0 (Invitrogen, USA) 進行 Est03 酯酶分子分析，包 pI 值、分子量、胺基酸組成等，並利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站之程式 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，進行 Est03 胺基酸序列與現有資料庫比對分析，以找出相近的蛋白質或酵素。

III. Est03 酯酶表現與純化

將經定序確認所構築之序列正確的重組質體 pPAL7-*est03* 轉形於表現宿主細胞 *E. coli* BL21 (DE3) (ECOSTM 21 (DE3), Yeastern Biotech Co., Ltd., Taiwan) 中，用以大量表現酯酶 Est03。挑選轉形株單一菌落於 3 mL 含有 50 μ g/mL 安比西林 (ampicillin, Amresco, USA) LB 液態培養基中，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 振盪培養過夜。翌日接種預培養液 (1%，v/v) 於 100 mL LB 液態培養基中，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 振盪培養。當菌液濃度 OD_{600 nm} 值達約 0.6 時，加入 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.25 mM) 誘導酯酶基因表現，並設定培養條件 18 $^{\circ}$ C、150 rpm，振盪培養 24 h。培養終止後，以離心機 (himac CR-30NX, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Japan) 設定 5,000 \times g、15 min、4 $^{\circ}$ C 離心條件以收集菌體，並保存在 -80 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中。

取出凍存之菌體，並以親和性蛋白質純化套組 (Profinity eXact Expression and Purification Starter Kit, Bio-Rad, USA) 進行純化。操作流程簡述如下，以 5 mL 分解萃取試劑 (BugBuster[®] Protein Extraction Reagent, Merck, USA) 回溶冷凍菌株，於室溫下搖晃作用 10 min，並以 10,000 \times g、4 $^{\circ}$ C 離心 30 min，取上清液並保存於 4 $^{\circ}$ C。吸取上清液注入管柱，溫和地將上清液與親和性樹脂 (Profinity eXactTM Purification Resin, Bio-Rad, USA) 充分混合，並於 4 $^{\circ}$ C 搖晃培養 20 min，以 1,000 \times g 離心 30 s，將流出液 (flowthrough) 留存於 4 $^{\circ}$ C。以緩衝清洗溶液 (100 mM sodium phosphate, pH 7.2) 均勻混合後離心，取得清洗液，重複此步驟，同樣留存第二次清洗液。加入溶析緩衝液 (elution buffer) 並與樹脂溫和混合，在室溫下搖晃作用至少 30 min，最後離心得到含標的酯酶 Est03 之溶析液。

IV. Est03 酯酶濃縮

使用離心過濾濃縮裝置 (Amicon® Ultra-15, Millipore, Ireland)，設定離心機 (himac CR-30NX, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Japan) 腔室溫度為 4°C，以 $5,000 \times g$ 離心 40 min，逐次置換緩衝液，將純化蛋白質之緩衝溶液由 100 mM sodium phosphate 置換為 50 mM pH 8.0 Tris-buffer，置換率為 99.97%，溶液濃縮倍率為 7 倍。

V. 蛋白質濃度測定與 SDS-PAGE 分析

蛋白質純化套組進行純化後，分別收集分解物、流出液、清洗液、第二次清洗液、溶析液及置換緩衝液濃縮溶析樣品 (concentrated elution sample)，於立式微型凝膠儀 (vertical mini-gel apparatus, Bio-Rad, Canada) 以 4 – 12% 之十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 確認蛋白質質量。在本次實驗中使用分子量標記 (Bio-Rad, Canada) 與樣品染色緩衝液 (Bio-Rad, Canada)。純化蛋白質濃度由檢驗套組 (Qubit® protein assay kit, Life Technologies, USA) 藉由螢光儀 (Qubit® Fluorometer, Life Technologies, USA) 進行定量。

VI. 受質專一性分析

以不同碳數之受質包括對硝基苯乙酸酯 (p-nitrophenyl acetate, C2 受質)、對硝基苯丙酸酯 (p-nitrophenyl propionate, C3 受質)、對硝基苯丁酸酯 (p-nitrophenyl butyrate, C4 受質)、對硝基苯戊酸酯 (p-nitrophenyl valerate, C5 受質) 及對硝基苯辛酸酯 (p-nitrophenyl caprylate, C8 受質) 酯酶之受質專一性分析。將受質溶於乙腈 (acetonitrile) 中，使其最終濃度為 50 mM。以 40°C 處理 5 min，測量其吸光值 (412 nm)。在不同測試條件下，每次試驗皆同時測定空白組，從結果中減去受質非專一性之水解值。酯酶對於對硝酸苯酚酯類 (p-nitrophenyl esters, pNPL) 基質之活性測定，藉由測定酯酶催化水解釋放之對硝基苯基 (p-nitrophenyl, pNP) 之量來確定活性。簡而言之，以 2 μ L 受質加入適量酯酶之緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中，使最終體積為 150 μ L，以水浴定溫反應 5 min，並以分光光度法 (412 nm) 測定。以不同濃度之對硝基苯酚 (4-nitrophenol) 之分光吸光值繪製檢量線，活性單位 (U) 定義為在測定條件下每 min 釋放 1 μ mol 的 pNP。

VII. 酵素動力學分析

Est03 的酵素動力學分析，係在 45°C 於緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中以 100 – 400 μ M 濃度的對硝基苯乙酸酯 (C2) 為受質進行反應。依據 Michaelis-Menten 方程式，以 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法，分別將受質濃度與反應速率倒數以求出酵素最大反應速率 (V_{max})、代表酵素與受質親和力之米氏常數 (K_m) 及轉換率 (k_{cat}) 等參數。

VIII. 溫度及 pH 對於 Est03 活性之影響

為了解 Est03 活性之最適溫度，將解脂酶置於緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中，以對硝基苯乙酸酯作為受質 (1 μ M)，分別於 25 – 55°C 作用 5 min。pH 對於 Est03 酵素活性的影響試驗如下：受質分別在不同酸鹼值之緩衝溶液 100 mM sodium citrate buffer (pH 5.0)、100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0、7.0、8.0)、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0、9.0)、100 mM Glycine-HCl (pH 10.0) 中，於 40°C 下各作用 5 min，以波長 348 nm (此波長吸光值與對硝基苯氧及對硝基苯酚之酸鹼值表現無關) 測定其吸光值並推算相對活性。

IX. 金屬離子、有機溶劑與介面活性劑對於 Est03 活性之影響

pNP 釋放試驗被用於檢視金屬離子、有機溶劑與介面活性劑對於解脂酶活性之影響，化學物質被溶入緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中至特定濃度，分別為 1 mM 之金屬離子、1% (v/v 或 w/v) 之介面活性劑及 10% 及 20% (v/v) 有機溶劑。受質於 40°C 下作用 5 min，再依據材料方法 VI. 之方法測定 Est03 活性，以未添加上述化學物質之水解條件為對照組 (活性 100%)。

X. 統計分析

各處理組間以單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 及 Tukey's Test 進行顯著性分析。結果以平均值 \pm 標準差 (Standard Deviation, SD) 表示， $P < 0.05$ 視為具顯著性差異。分析軟體為 Prism6, Graphpad Software, San Diego, (<http://www.graphpad.com>)。

結果與討論

I. *est03* 基因次選殖與分子分析

先前研究，從活性污泥篩選而得具解脂活性的株系 ASL03 與其重組質體 pASL03，經由 DNA 與胺基酸序列分析得知含有一個稱為 Lipo3 的 ORF，具有分解三丁酸甘油酯的活性。經選殖試驗，已成功將此 Lipo3 次

選殖於表現載體 (pPAL7) 上，並重新命名為 *est03* 基因。此基因長 762 bp，可轉譯為含 253 個胺基酸的酯酶 Est03，蛋白質分子大小約為 28.8 kDa，pI 為 5.87。由 Est03 胺基酸序列與 NCBI 資料庫比對結果，比對分數前三高的蛋白質分別為源自 freshwater metagenome 中 *Bacteroidia bacterium* 的 α/β 水解酶 (accession number: MBL0912272.1)，比對分數 331，期望值 $2e-111$ ，相同度為 58.33%；次高者為 *Flavobacterium* sp. FPG59 的 α/β 水解酶 (accession number: WP_086452924.1)，比對分數 273，期望值 $9e-89$ ，相同度為 49.40%；第三高者為 *Flavobacterium sediminis* 的 α/β 水解酶 (accession number: WP_109569374.1)，比對分數 270，期望值 $2e-87$ ，相同度為 49.80%，然三者皆為序列推估而來的酵素，並未經過特性分析。

II. Est03 酯酶純化

藉由親和性純化套組，可將酵素蛋白質自菌體蛋白中分離與純化，重組標的酵素蛋白 rEst03 (recombinant Est03) 藉由其胺基端長 75 個胺基酸的親和性標籤 (profinitiy eXact tag) 吸附於純化樹脂，其他雜蛋白則透過洗脫步驟而與標的蛋白質分離，待將雜質洗淨後施以溶析液進行截切作用後，使 Est03 被切除親和性標籤而成為原始態 Est03。由 SDS-PAGE Lane 1 與 Lane 2 (圖 1) 比較可見，具親和性標籤之 rEst03 與分子量約為 36 kDa，Lanes 2 的重組標的酵素蛋白 rEst03 大於 lane 6 的 Est03，符合估算之 Est03 分子質量 (約為 28 kDa)，並與先前研究預測解脂酶第五家族之分子質量平均為 30 kDa 之特徵相符 (Hausmann *et al.*, 2010)。藉由離心過濾濃縮裝置，可置換緩衝溶液，減少後續實驗中之干擾，並且提高蛋白質酵素濃度。由螢光檢驗套組檢驗蛋白質濃度得知濃縮前為 51.2 $\mu\text{g/mL}$ ，濃縮後濃度為 120 $\mu\text{g/mL}$ 。

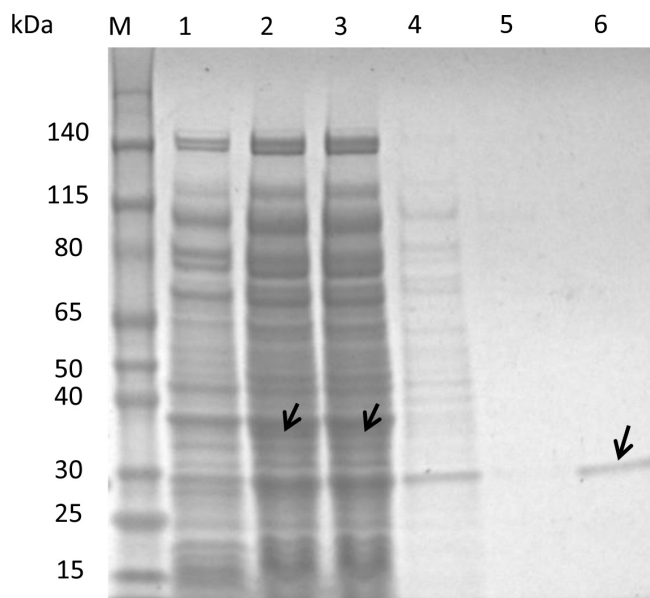


圖 1. 以 SDS-PAGE 分析之 Est03 純化情形。

變性樣品在梯度 4 - 12% 膠片上進行電泳分析。Lane M 為蛋白質大小標記，Lane 1 為無轉形之 pPAL7 表現載體總溶解細胞蛋白質，Lane 2 為總溶解細胞蛋白質，Lane 3 為流出液，Lanes 4 - 5 為清洗液，Lane 6 為去標籤之 Est03 溶析液。黑色箭頭所指分別為帶有純化標籤與切除純化標籤的 Est03。

Fig. 1. The Est03 purification was profiled with SDS-PAGE.

Samples were run on a gradient (4 - 12%) gel under denaturing conditions. Lane M, protein molecular mass ladder; lane 1, total soluble cell protein of cells only transforming expression vector pPAL7; lane 2, total soluble cell protein of cells with regenerating EST03; lane 3, flowthrough; lanes 4 - 5, washed fractions; lane 6, elution of tag-free Est03; lane 6, purified and concentrated Est03 in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8). The arrows indicate the Profinitiy eXact tagged Est03 and tag-free Est03, respectively.

III. 受質專一性與酵素動力學分析

Est03 的酵素活性分析顯示其水解受質活性僅限為對硝基苯乙酸酯、對硝基苯丙酸酯、對硝基苯丁酸酯、對硝基苯戊酸酯及對硝基苯辛酸酯等 C2 - C8 對硝酸苯酚酯類 (圖 2)，證實其為酯酶 (esterase)。其中，Est03 對於 C2 之對硝基苯乙酸酯具有高度專一性，比活性為 12.15 unit/mg，最高催化速率 (V_{\max}) 為 $6.44 \times 10^{-1} \mu\text{Ms}^{-1}$ 、最佳親和力濃度 (K_m) 為 98.17 μM 、 k_{cat} 為 $1.55 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ ， k_{cat}/K_m 為 $1.58 \times 10^{-3} \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 對 C2 水解活性顯著地高於其他短鏈之對硝基苯酯受質。此特性與酵素蛋白 Est8 相似，推測是由於活性位空間相對狹小，缺乏可延伸的受

質通道，因此對於對硝基苯乙酸酯之活性較高 (Pereira *et al.*, 2017)。

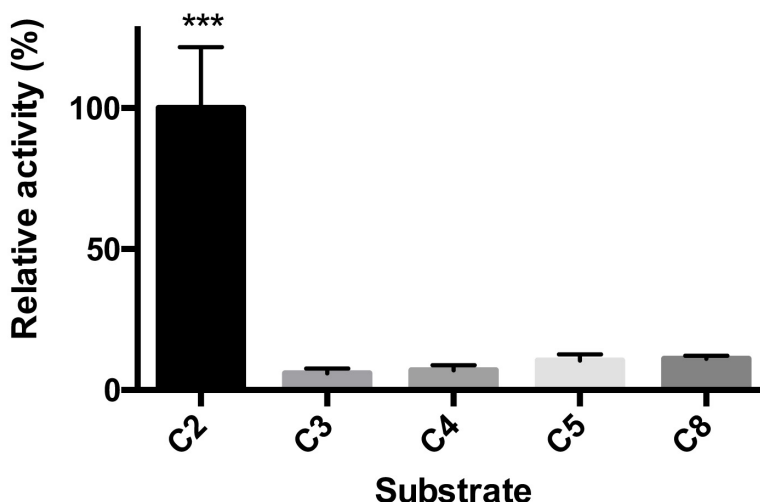


圖 2. 酯酶 Est03 受質專一性分析結果。

Est03 與 C2 受質對硝基苯乙酸酯反應之相對活性定為 100%。*** Est03 對 C2 受質活性顯著 ($P < 0.001$) 高於其他受質試驗組。

Fig. 2. The substrate specificity of the purified esterase Est03.

The relative activity of Est03 in reaction buffer with the substrate p-nitrophenyl acetate, C2 was defined as 100%. *** The C2 substrate specificity of Est03 are statistically significant ($P < 0.001$) higher than other substrates in the experiment.

IV. 溫度與 pH 對於酵素活性影響

基於受質專一性試驗結果，以對硝基苯乙酸酯作為受質做進一步的酵素特性分析。藉由檢測 20 – 55°C 時 Est03 酵素水解硝基苯乙酸酯程度，了解溫度對 Est03 酵素活性之影響，並以酵素活性最高的 45°C 值為 100%。結果顯示 Est03 為一種中溫酶，在 45°C 時具有最佳活性，但在 20°C 時相對活性高於 49%，在 50°C 時相對活性仍有 84%，此後其活性才急速下降 (圖 3)。其溫和的熱穩定性可能是由於 Est03 是為單體蛋白，並且在催化域中的離子對並不會相互作用 (Manco *et al.*, 2001)。此種溫度耐受範圍大的特性，使之更適合做為產業應用。

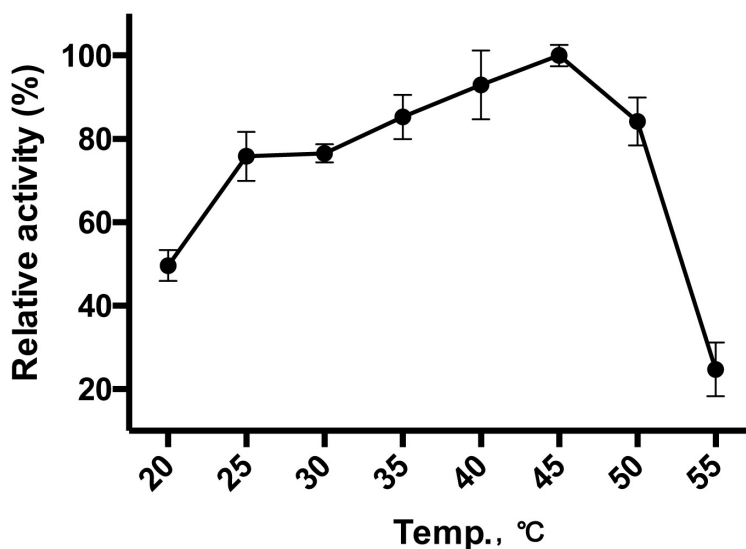


圖 3. 溫度對酯酶 Est03 活性之影響。

在不同溫度與在 pH 8.0 環境下，以不同溫度測定 Est03 之酵素活性，並以 45°C 測得之酵素活性定為相對 100%。誤差棒表示為標準差。

Fig. 3. The effect of temperature on the activity of esterase Est03.

Enzyme activity was measured at various temperatures at pH 8.0 under standard assay conditions. The relative activity obtained at 45°C was taken as 100%. Error bars indicate standard deviations.

許多研究顯示，源自於多源基因體的酯酶在 pH 8.0 – 9.0 間的緩衝液中有較佳的活性表現 (Peng *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015)。此外，大部分第五家族酯酶在 pH 8.0 – 9.5 間具有最高的活性，而少數具有極端的鹼穩定性 (pH 10.0 – 12.0) (Yang *et al.*, 2018)。Est03 在不同酸鹼值的誤差範圍較大，酸鹼度對其影響較為和緩，不同緩衝溶液也會對其活性造成些許影響，如 pH 8.0 下 sodium phosphate buffer 與 Tris-HCl buffer 影響酵素活性百分比並未重疊，但也未有顯著差異。Est03 在 pH 6.5 至 pH 9.0 間有大於 50% 之相對活性，但於 pH 10.0 則無偵測到酵素活性。結果顯示 pH 8.0 (Tris-HCl buffer) 的 Est03 活性優於在其他 pH 值。

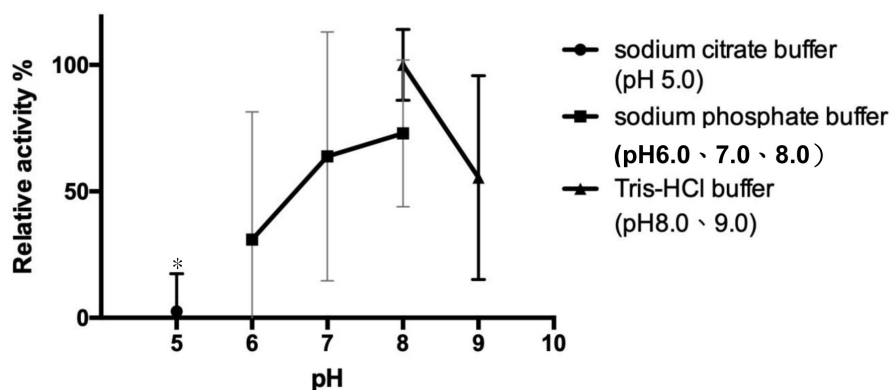


圖 4. pH 值對酯酶 Est03 活性之影響。

Est03 在不同 pH 緩衝液之酵素活性，以測定 348 nm 之吸光值呈現，並將在 Tris-HCl buffer pH 8.0 的作用條件測得之酵素活性定為 100%。誤差棒表示為標準差。* 於 pH 5.0 下之活性顯著 ($P < 0.05$) 小於對照組 (Tris-HCL buffer pH 8.0)。

Fig. 4. The effect of pH on the activity of esterase Est03.

The enzyme activity was measured at absorbance 348 nm in various pH buffers. The value obtained at Tris-HCl pH 8.0 buffer was taken as 100%. Error bars indicate standard deviations. * pH 5.0 are statistically significant ($P < 0.05$) difference from control (Tris-HCL buffer pH 8.0).

V. 金屬離子、介面活性劑及有機溶劑之影響

許多利用生物技術來製造產物之製程中反應介質會存有離子，因而使酵素活性受到影響 (Bofill *et al.*, 2010)。因此，本試驗評估 Est03 在濃度 1 mM 之不同金屬離子存在時的活性 (表 1)。在 K^+ 存在的狀況下，Est03 之活性與對照組相比，並沒有顯著的差別，此外，在 Ni^{2+} 存在下，相對活性則可升高 14%，不似其他第五家族解脂酶活性被 Ni^{2+} 抑制 (Peng *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Istvan *et al.*, 2018)。相反的，Est03 在 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 存在的情況下，酵素活性略微降低，分別被抑制 9% 及 11%。

表 1. 不同化合物與介面活性劑對 Est03 相對酵素活性的影響

Table 1. The effect of various compounds on the stability of Est03

Compound	Relative activity [§] (%)
Cation (1 mM)	
CaCl ₂	91.36 ± 0.09
MgCl ₂	89.02 ± 0.03
KCl	102.80 ± 0.06
NiSO ₄	114.25 ± 0.12
Surfactant (1%)	
Tween 20	167.76 ± 0.10
Tween 40	62.51 ± 0.08
Tween 80	107.69 ± 1.04
Triton X-100	82.42 ± 0.39
SDS	-

[§] The relative activity of Est03 in reaction buffer without any cation or surfactant was defined as 100%. All values are statistically significant difference from control ($P < 0.001$).

- Not detectable.

介面活性劑如 Tween-20 常被用作乳化劑以增強受質之乳化性，增加受質之加工彈性。在 1% (v/v 或 w/v) 之濃度下，觀測到介面活性劑 Tween-40 對於酵素活性有抑制效果，剩 62.51%；SDS 使之失去活性；然而在 Tween-20 存在下，反而會增進酵素活性達 67.76%，其他第五家族解脂酶則不受影響 (Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018) 或是受到抑制 (Chen *et al.*, 2013; Istvan *et al.*, 2018)。整體而言，Est03 之活性顯著受介面活性劑促進或是抑制。

在特定製程中，酵素常需要在有機溶劑中作用，然而在有機質中的酵素活性與其本身特質具有高度相關 (Krieger *et al.*, 2004)。酵素為蛋白質組成，存於 10 – 20% 有機溶劑之溶液時易喪失活性 (Verger *et al.*, 1997)，因此非常少見酵素活性在有機溶劑中具增強效果 (Kamal *et al.*, 2013)。因此，本實驗中使用不同種類 10 及 20% (v/v) 有機溶液作為共同溶劑以測定其活性。Est03 之活性在 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (129.3%)、20% DMSO (145.51%) 皆增強，其他第五家族酵素之活性在 DMSO 中不變 (Zhang *et al.*, 2017)，或有增強及減弱者 (Tchigvintsev *et al.*, 2015)。在 10% 乙醇 (81.05%) 及 20% 乙醇 (58.35%) 下抑制酵素活性。10% 異丙醇 (19.83%) 及 10% 丙酮 (35.97%) 使酵素活性大幅下降，而在 20% 丙酮 (5.74%) 存在下，酵素喪失超過 90% 活性，20% 異丙酮則使酵素失活。

表 2. 有機溶劑對酯酶 Est03 穩定度之影響

Table 2. The effect of organic solvents on the stability of esterase Est03

Solvent	Relative activity [§] (%)	
	10	20
Ethanol	81.05 ± 0.18	58.35 ± 0.15
Isopropanol	19.83 ± 0.09	-
Acetone	35.97 ± 0.08	5.74 ± 0.05
DMSO	129.30 ± 0.18	145.51 ± 0.12

[§] The relative activity of Est03 in reaction buffer without organic solvent was defined as 100%.

All values are statistically significant difference from control (P < 0.001).

- Not detectable.

結 論

本研究結果顯示，來自養豬廢水處理活性污泥之多源基因庫的新穎酯酶 Est03，在較寬的溫度範圍、中性至微鹼性、有機溶劑及介面活性劑環境下，皆有一定的活性表現，且特別對極短碳鏈脂肪酸 (C2) 具有最高的活性，因此，未來可利用此種特性而應用於乳酪或生質柴油產業。

參考文獻

- Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Amann, R. I., Ludwig W, and Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-69.
- Berini, F., C. Casciello, G. L. Marcone, and F. Marinelli. 2017. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiol. Lett.* 364: 1-19.
- Bofill, C., N. Prim, M. Mormeneo, A. Manresa, F. I. Javier Pastor, and P. Diaz. 2010. Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. *Biochimie.* 92: 307-316.
- Brault, G., F. Shareck, Y. Hurtubise, F. Lépine, and N. Doucet. 2014. Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. *PLoS One.* 9: e91872.
- Chen, K., Y. Liu, D. M. Mao, X. M. Liu, S. P. Li, and J. D. Jiang. 2013. An essential esterase (BroH) for the mineralization of bromoxynil octanoate by a natural consortium of *Sphingopyxis* sp. strain OB-3 and *Comamonas* sp. strain 7D-2. *J. Agric. Food Chem.* 61: 11550-11559.
- Culligan, E. P., R. D. Sleator, J. R. Marchesi, and C. Hill. 2014. Metagenomics and novel gene discovery: promise and

- potential for novel therapeutics. *Virulence* 5: 399-412.
- Hausmann, S. and K. E. Jaeger. 2010. Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: K. N. Timmis, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1099-1126.
- Istvan, P., A. A. Souza, A. V. Garay, D. F. K. dosSantos, G. M. deOliveira, R. H. Santana, F. A. C. Lopes, S. M. deFreitas, J. A. R. G. Barbosa, and R. H. Krüger. 2018. Structural and functional characterization of a novel lipolytic enzyme from a Brazilian Cerrado soil metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* 40: 1395-1406.
- Kamal, Z., P. Yedavalli, M. V. Deshmukh, and N. M. Rao. 2013. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. *Protein Sci.* 22: 904-915.
- Krieger, N., T. Bhatnagar, J. C. Baratti, A. M. Baron, V. M. DeLima, and D. Mitchell. 2004. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 279-286.
- Liaw, R. B., M. P. Cheng, M. C. Wu, and C. Y. Lee. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 101: 8323-8329.
- Manco, G., L. Mandrich, and M. Rossi. 2001. Residues at the active site of the Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature. *J. Biol. Chem.* 276: 37482-37490.
- Molina-Muñoz, M., J. M. Poyatos, B. Rodelas, C. Pozo, M. Manzanera, E. Hontoria, and J. Gonzalez-Lopez. 2010. Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresour. Technol.* 101: 696-04.
- Privé, F., N. N. Kaderbhai, S. Girdwood, H. J. Worgan, E. Pinloche, N. D. Scollan, S. A. Huws, and C. J. Newbold. 2013. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. *PLoS One.* 8.
- Peng, Q., X. Zhang, M. Shang, X. Wang, G. Wang, B. Li, G. Guan, Y. Li, and Y. Wang. 2011. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. *Microb. Cell Fact.* 10: 1-11.
- Pereira, M. R., G. F. Mercaldi, T. C. Maester, A. Balan, and E. G. M. Lemos. 2015. Est16, a new esterase isolated from a metagenomic library of a microbial consortium specializing in diesel oil degradation. *PLoS One.* 10: 1-16.
- Pereira, M. R., T. C. Maester, G. F. Mercaldi, E. G. M. Lemos, M. Hyvönen, and A. Balan. 2017. From a metagenomic source to a high-resolution structure of a novel alkaline esterase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 4935-4949.
- Raveendran, S., B. Parameswaran, S. B. Ummalyma, A. Abraham, A. K. Mathew, A. Madhavan, S. Rebello, and A. Pandey. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol.* 56: 16-30.
- Rodrigues, R. C., J. J. Virgen-Ortiz, J. C. S. Dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, and R. Fernandez-Lafuente. 2019. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.* 37: 746-770.
- Straathof, A. J. J., S. Panke, and A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.
- Sumby, K. M., P. R. Grbin, and V. Jiranek. 2013. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J. Appl. Microbiol.* 114: 413-422.
- Tchigvintsev, A., H. Tran, A. Popovic, F. Kovacic, G. Brown, R. Flick, M. Hajighasemi, O. Egorova, J. C. Somody, D. Tchigvintsev, A. Khusnutdinova, T. N. Chernikova, O. V. Golyshina, M. M. Yakimov, A. Savchenko, P. N. Golyshin, K. Jaeger, and A. F. Yakunin. 2015. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 2165-2178.
- Uchiyama, T. and K. Miyazaki. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 616-622.
- Verger, R. 1997. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15: 32-38.
- Yang, X., L. Wu, Y. Xu, C. Ke, F. Hu, X. Xiao, and J. Huang. 2018. Identification and characterization of a novel alkalistable and salt-tolerant esterase from the deep-sea hydrothermal vent of the East Pacific Rise. *Microbiologyopen* 7: 1-10.
- Zhang, Y., J. Hao, Y. Q. Zhang, X. L. Chen, B. B. Xie, M. Shi, B. C. Zhou, Y. Z. Zhang, and P. Y. Li. 2017. Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from the deep-sea sediment of the South China sea. *Front. Microbiol.* 8: 1-10.

Purification and characterization of a novel esterase Est03 derived from an activated sludge metagenome ⁽¹⁾

Tzu-Hsuan Huang ⁽²⁾ and Ren-Bao Liaw ^{(3) (4)}

Received: May 24, 2021; Accepted: Jan.19, 2022

Abstract

The purpose of this research was to perform sub-cloning, expression, purification, and characterization of the novel esterase gene *est03* selected from the activated sludge metagenome for subsequent research and application. The *est03* gene is 762 bp in length and can be translated into an esterase, namely Est03, which contains 253 amino acids with a molecular mass of about 28.8 kDa. The *est03* gene was sub-cloned on the expression vector pPAL7 and transformed into the expression host *Escherichia coli* BL21 (DE3). After the transformant was induced by IPTG to express a large number of target proteins, the expressed esterase was purified and excised using the purification kit to become a purified enzyme with the same amino acid sequence of the original esterase. It was found that Est03 had a higher preference for short-chain fatty acid substrates, and particularly the two-carbon substrate (C2) activity was significantly higher than others ($P < 0.001$). The temperature test showed that the esterase expressed higher activity between 35 - 50°C, with the optimal temperature of 45°C. The specific activity and k_{cat}/K_m of Est03 was 12.15 unit/mg and $1.58 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, respectively. Est03 had greater than 50% activity between pH 6.5 and pH 9.0, with the highest activity at pH 8.0. At the same time, Est03 was active in common types and concentrations of organic solvents, metal ions, and surfactants. In summary, Est03 has noteworthy biochemical properties and the potential for development in the applications of the biotechnology industry

Key words: Activated sludge metagenome, Novel esterase, Characterization.

(1) Contribution No. 2692 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw.