

低温脂肪酶的分离纯化及酶学性质

王春雨, 迟乃玉*, 张庆芳, 窦少华

(大连大学 生命科学与技术学院 / 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心, 辽宁 大连 116622)

摘要: 苏云金芽胞杆菌 CZW001 脂肪酶发酵上清液经硫酸铵沉淀、透析、超滤离心、DEAE-纤维素-52 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析得到电泳纯的脂肪酶, 纯化倍数为 75.5 倍, 活性回收率为 37.6%, 12%SDS-PAGE 电泳估计其相对分子质量约 40 000。对纯化后的脂肪酶进行酶性质研究表明: 酶的最适作用温度为 25 ℃, 对热敏感, 60 ℃处理 30 min 仅残留 30%酶活性; 酶的适宜作用 pH 范围在 7~9, 最适 pH 为 8; 该脂肪酶的水解活性对 Ca^{2+} 表现明显的依赖性, Al^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} 对脂肪酶有显著的抑制作用; 脂肪酶对醇类有机溶剂的耐受性随碳链增加而减小; 脂肪酶对豆油表现出显著的特异性, 而蓖麻油抑制脂肪酶水解活力。

关键词: 脂肪酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: Q 55 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)08—0809—05

Purification and Enzymatic Properties of Cryogenic Lipase

WANG Chun-yu, CHI Nai-yu*, ZHANG Qing-fang, DOU Shao-hua

(College of Life Science and Technology, Dalian University / Liaoning Technology of Marine Microbiological Engineering Research Center, Dalian 116622, China)

Abstract: A lipase from *Bacillus thuringiensis* CZW001 was purified to homogeneity using ammonium sulfate precipitation, dialysis, DEAE-cellulose-52 anion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography. This purification protocol resulted in a 75.5 fold purification of lipase with 37.6% final yield, and the relative molecular weight of the enzyme was determined to be approximately 40kD using SDS-PAGE. Preliminary studies have shown that the enzymatic properties of bacteria lipase, the enzyme's optimum temperature is 25 ℃ and the enzyme was thermal lability, only 30% of its activity was remained after 30 min incubation at 60 ℃. The enzyme showed high lipolytic from pH 7.0 to 9.0 and its optimal pH for activity was 8.0. Ca^{2+} ions stimulated lipolytic activity, whereas Al^{3+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} ions caused inhibition. Lipase tolerance of organic solvents of alcohols with carbon chain decreases. Lipase on soybean oil showed a significant the hydrolysis of the lipase.

Keywords: lipase, purification, enzymatic properties

收稿日期: 2012-10-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA021306)。

作者简介: 迟乃玉(1965—), 男, 辽宁大连人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物技术方面的研究。E-mail: cyn7566@126.com

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3), 甘油三酯酯水解酶) 是一类重要的工业酶, 可以在油水界面上催化甘油三酯水解生成脂肪酸和甘油以及甘油一酯和甘油二酯, 广泛存在于动物、植物各种组织及微生物中, 是最早研究的酶类之一^[1]。根据 Msrgrsin 等人的定义^[2], 把最适酶活温度在 30 ℃ 左右, 在 0 ℃ 左右仍有一定催化活性的脂肪酶称为低温脂肪酶。而大多数低温脂肪酶是由低温微生物生产, 它们长期生活于低温环境中, 如南极、北极以及海洋底部等极端环境中。目前所发现的产低温脂肪酶的低温微生物大都属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 等^[3-4]。

低温脂肪酶具有高效、可低温下作用、作用周期短等优势, 在应用上具有中高温脂肪酶无法取代的优越性, 因此在食品、轻纺、化妆品、洗涤剂、有机合成、环境治理以及医药等领域上有广泛的应用前景。微生物脂肪酶种类多, 作用温度及 pH 值范围比动植物脂肪酶广, 底物专一性高, 且便于工业生产以获得较高纯度的酶制剂, 已成为工业生产脂肪酶的主要来源^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料

产低温脂肪酶菌株: 由作者所在实验室从大连大黑山土壤和渤海海水中分离筛选得到。结合菌落形态学、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 参照齐祖同^[6]和 Accensi^[7]等方法, 鉴定并命名为苏云金芽胞杆菌 CZW001 (*Bacillus thuringiensis* CZW001)。

1.2 方法

1.2.1 苏云金芽胞杆菌 CZW001 发酵 将菌株 CZW001 活化后, 接种于种子液中 (胰蛋白胨 1.0 g/dL, 酵母提取物 0.5 g/dL, NaCl 1.0 g/dL, 琼脂 1.5 g/dL, pH 7.0), 20 ℃、160 r/min 培养 12 h, 转接于 100 mL 发酵液中 (酵母膏 0.5 g/dL, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/dL, KH₂PO₄ 0.2 g/dL, NaCl 0.3 g/dL, MgSO₄·7H₂O 0.05 g/dL, 橄榄油体积分数 2%, pH 7.0), 20 ℃、160 r/min 培养 2 d。发酵液 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min, 获取上清液。

1.2.2 硫酸铵沉淀 将 100 mL 发酵上清在冰浴中边搅拌边缓慢加入硫酸铵粉末至 65% 饱和度, 4 ℃ 静置 4 h。离心收集沉淀, 将沉淀溶解于 50 mL、0.05 mol/L pH 8.2 的 Tis-HCl 缓冲液中, 并用相同

的缓冲液 4 ℃ 透析 12 h。

1.2.3 超滤浓缩 经截留相对分子质量为 10 000 的中空纤维柱超滤浓缩。

1.2.4 离子交换层析 先用 Tis-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L pH 8.2) 以 0.5 mL/min 的流速平衡 DEAE-纤维素-52 层析柱 (1.6 cm×30 cm) 5~10 个体积, 直至 UV280 成水平直线上。将 2 mL 浓缩液加到层析柱上, 用 250 mL 0~1 mol/L 的 NaCl 以 0.3 mL/min 的流速线性梯度洗脱。利用平板定性检测脂肪酶活性, 收集含脂肪酶各管, 测定其酶活, 合并含酶活各管。

1.2.5 凝胶过滤层析 Sephadex G-100 (Φ1.6×50 cm) 预先用 Tis-HCl 缓冲液 (0.05 mol/L pH 8.2) 以 0.3 mL/min 的流速平衡。将含脂肪酶样品 2 mL 超滤浓缩后上柱, 用 0.05 mol/L pH 8.2 Tis-HCl 缓冲液洗脱, 收集有酶活性部分。

1.2.6 蛋白质浓度的测定 采用 Bradford 法^[8]进行测定, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.7 脂肪酶活性的测定 采用分光光度计法测定脂肪酶活性。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶的分离纯化

苏云金芽胞杆菌 CZW001 脂肪酶发酵上清液经硫酸铵沉淀、超滤离心、DEAE-纤维素-52 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析等纯化步骤, 脂肪酶纯化倍数为 75.5 倍, 活性回收率为 37.6%。其中 DEAE-纤维素-52 离子交换层析效果最佳, 仅此一步就纯化了 56 倍, 纯化效果见表 1。SDS-PAGE 凝胶电泳^[9]显示纯化后的脂肪酶为单一条带, 见图 1, 相对分子质量约为 40 000。

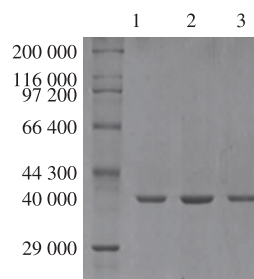


图 1 12 g/dL SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 1 12 g/dL SDS-PAGE of enzyme solution

2.2 低温脂肪酶酶学性质

2.2.1 pH 对脂肪酶活力的影响 在 30 ℃、pH 4.0~10.0 的缓冲溶液中分别测定脂肪酶, 测定 3 次求平

表 1 脂肪酶的纯化

Table 1 Purification of *Bacillus thuringiensis* CZW001 lipase

步骤	总蛋白质质量/ μg	总活力/U	回收率/%	比活/(U/mg)	纯化倍数
粗酶液	96 329.3	2 369.7	100	24.6	1.0
硫酸铵沉淀	52 367.9	2 021.4	85.3	38.6	1.6
超滤浓缩	9 791.1	1 860.2	78.5	211.6	8.6
DEAE-纤维素层析	822.7	1 331.8	56.2	1618.8	65.8
Sephadex-G100	480.0	891.0	37.6	1856.3	75.5

均酶活力,结果见图 2。该脂肪酶的适宜作用 pH 范围在 7~9,最适 pH 为 8。

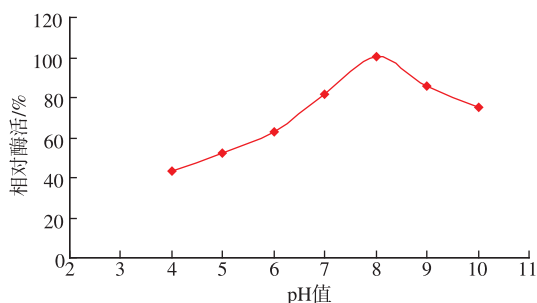


图 2 pH 值对酶活力的影响

Fig. 2 Effects of pH on lipase activity

2.2.2 温度对脂肪酶活力的影响 在 pH 8.0 条件下,测定 0~45 °C 酶活力与温度的关系,结果见图 3。CZW001 脂肪酶活力在 25 °C 达到最高,在 0 °C 是仍具有酶活,相对酶活达 10%。

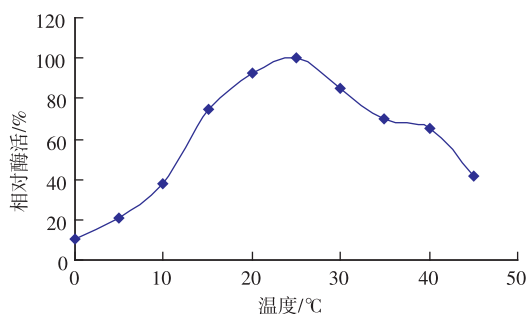


图 3 温度对酶活力的影响

Fig. 3 Effects of temperature on lipase activity

2.2.3 温度对酶稳定性的影响 将酶液在不同温度下作用不同时间,测定低温脂肪酶残余活力。结果见图 4。菌株 CZW001 脂肪酶稳定性较差,在 60 °C 处理 30 min,酶活损失达 70%。

2.2.4 金属离子对酶活性的影响 酶催化效果受诸多因素的影响,如不同的金属离子对酶活力的影响不同。它们有可能是酶的组成部分,也有可能是

酶的激活剂或抑制剂。因而向酶解环境中或酶制剂储存过程中添加不同的金属离子对酶的催化效率及其稳定性影响较大,在酶反应液中加入 Pb^{2+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Al^{3+} 、 Li^{+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 及 EDTA,使其终浓度为 1 mmol/L,同时以不加金属离子的酶液作为对照,测定脂肪酶的活性,结果见图 5。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Cu^{2+} 能提高脂肪酶的活力,尤其是 Ca^{2+} 作用最为明显,达到 230%。 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对苏云金芽孢杆菌 CZW001 脂肪酶有显著的抑制作用,尤其是 Zn^{2+} 和 Fe^{2+} ,仅保留 32% 和 24% 的残余酶活力,这与 Sugihara 报道的实验结果一致^[10]。 Pb^{2+} 、 Na^{+} 、 Li^{+} 、 Mn^{2+} 和 EDTA 对苏云金芽孢杆菌 CZW001 脂肪酶活力影响不明显。

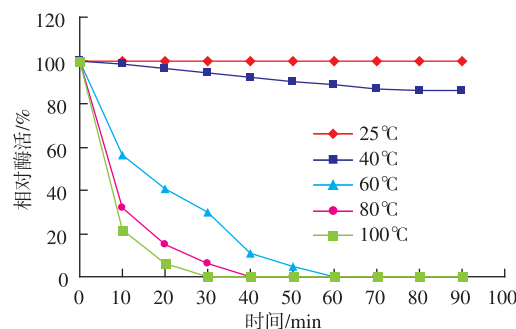


图 4 温度对酶稳定性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on lipase stability

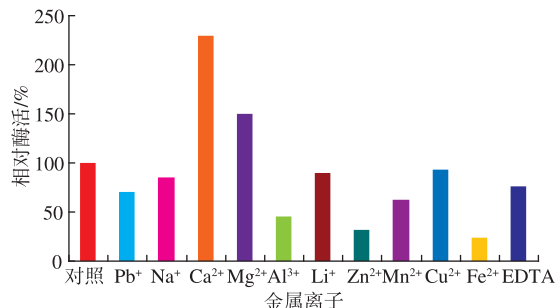


图 5 金属离子及 EDTA 对酶活性的影响

Fig. 5 Effect of metal ion and EDTA on enzyme

2.2.5 不同有机溶剂对脂肪酶活力的影响 如图6所示,脂肪酶对醇类有机溶剂的耐受性随碳链增加而减小,因此在进行酯化反应或转酯反应时宜选用短链醇或短链酯(如乙酸甲酯)作为反应底物。

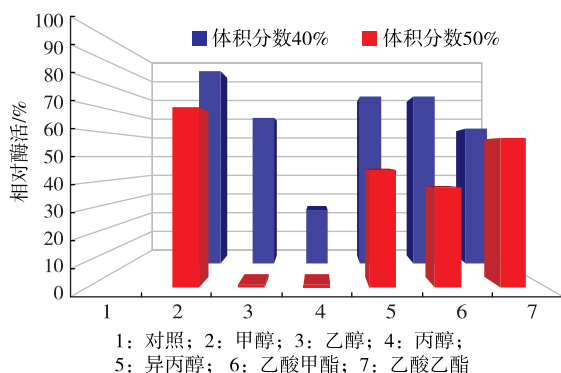


图6 脂肪酶在不同有机溶剂中的稳定性

Fig. 6 Effect of various organic solvents on lipase stability

2.2.6 脂肪酶对不同油脂的水解特异性 分别以橄榄油、豆油、桐油、菜籽油、茶油、棉籽油、蓖麻油和甘油三酯作为水解底物,测定脂肪酶活力,结果见图7。

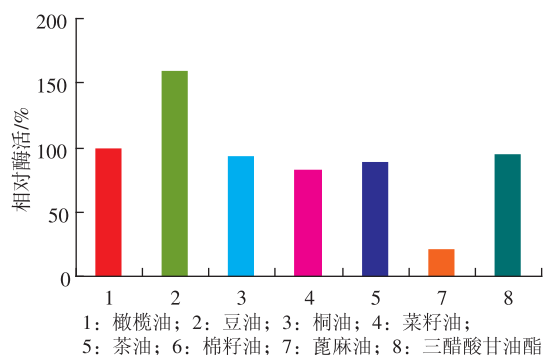


图7 脂肪酶水解不同油脂的底物特异性

Fig. 7 Substrate specificity of the lipase to various oils

该脂肪酶对豆油表现明显的特异性,对橄榄油、桐油、菜籽油、茶油、棉籽油、蓖麻油、三醋酸甘油

酯未表现出特异性,而水解蓖麻油能力最低,是蓖麻油酸值过高(大于33.45)抑制了脂肪酶的水解活力,而不是因为油脂中脂肪酸碳链长度的差异造成的(上述油脂中主要脂肪酸碳链均为C₁₈)。

3 结 语

Bacillus thuringiensis CZW001 脂肪酶发酵上清液经硫酸铵沉淀、透析、超滤离心、DEAE-纤维素-52 离子交换层析和 Sephadex G-100 凝胶过滤层析得到电泳纯的脂肪酶,跑 SDS-PAGE 凝胶电泳,相对分子质量大约为 40 000,与已报道低温脂肪酶相对分子质量大小有区别,如 *Pseudomonas frasi* 脂肪酶相对分子质量为 32 500^[11],*Pseudomonas sp.* Strain KB700 脂肪酶相对分子质量为 49 900^[12]。

Bacillus thuringiensis CZW001 脂肪酶的最适作用温度为 25 ℃,对热敏感,60 ℃处理 30 min 仅残留 30%酶活性,酶的适宜作用 pH 范围在 7~9,最适 pH 为 8,大多低温脂肪酶对热敏感,如 *Pseudomonas sp.* Strain KB700 脂肪酶^[12]在 60 ℃处理 5 min,残余酶活就急剧降低 70%,LipP^[13]在 60 ℃处理 30 min,残余酶活为 25%。

Bacillus thuringiensis CZW001 脂肪酶的水解活性对 Ca²⁺表现明显的依赖性,而 Al³⁺、Zn²⁺和 Fe²⁺对脂肪酶有显著的抑制作用。到目前为止,细菌脂肪酶 Ca²⁺的结合位点和 Ca²⁺对脂肪酶的激活机理已基本清楚,但脂肪酶活性对 Ca²⁺的依赖性表现出来的差异是否说明了脂肪酶在结构上存在差异^[14],有待进一步证实。

总之,该低温脂肪酶具有高效、耐碱和对热敏感等特点,在食品、洗涤、纺织以及环境治理等领域有良好的应用前景。尤其在食品行业中,由于对热敏感,从而避免高温灭活对食品品质产生的破坏。

参考文献:

- [1] QU YEN D T, SCHMIDT-DANNERT C, SCHMID R D. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BT L2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase [J]. *Protein Expression and Purification*, 2003, 28 (1): 102-110.
- [2] 林学政, 边际. 极地微生物低温适应性的分子机制[J]. 机制极地研究, 2003, 15(1): 75-82.
LIN Xue-zheng, BIAN ji. Molecular mechanism of cold-adaptation of polar microorganisms [J]. *Chinese Journal of Polar Research*, 2003, 15(1): 75-82. (in Chinese)
- [3] Rashid N, Shimada Y. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas sp.* strain KB700A [J]. *Applied and*

- Environmental Microbiology**, 2001, 67(9):4064–4069.
- [4] Han-Ki Lee, Min-Jung Ahn. Purification and characterization of cold active lipase from *Psychrotrophic aeromonas* sp. LPB 4[J]. **The Journal of Microbiology**, 2003, 41(1):22–27.
- [5] 王蕾,蔡宇杰. 一株碱性低温脂肪酶产生菌发酵条件的优化[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(3):1673–1689.
WANG Lei, CAI Yu-jie. Optimization of eementation conditions for a low-temperature lipase-producing strain [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008, 27(3):1673–1689. (in Chinese)
- [6] Qi Z T. Flora Fungorum Sinicorum: *Aspergillus et teleomorphi* Cognati[M]. Beijing: Science Press, 1997.
- [7] Accensi F, Cano J, Fignera L, et al. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 1999, 180(2):191–196.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. **Analytical Biochemistry**, 1976, 72:248–254.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**, 1970, 227(5259):680–685.
- [10] Sugihara A, Shimada Y, Tominaga Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase[J]. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1988, 52(6):1591–1592.
- [11] Alquati C L, De Gioia, G Santarossa, et al. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. heterologous expression, biochemical characterization and molecular[J]. **Eur J Biochemical**, 2002, 269:3321–3328.
- [12] Rashid N Y, Shimada S, Ezaki H Atomi, et al. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67:4064–4069.
- [13] Choo, D W T Kurihara, T Suzuki, et al. A cold-adapted lipase of an alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization[J]. **Appl Environ Micobiol**, 1998, 64:486–491.
- [14] Amada K, Kwon H J, Haruki M, et al. 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.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第一届中美多肽和蛋白质科学国际论坛

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学、生物技术与生物工程

开始日期: 2013-09-15

结束日期: 2013-09-17

主办单位: 西安交通大学

承办单位: 生命科学与技术学院、前沿科学技术研究院、转化医学研究中心

议题: 蛋白质全化学合成技术及应用、抗微生物多肽天然免疫机制和应用

会议主席: 陆五元博士, 西安交通大学特聘教授、转化医学研究中心主任

联系人: 康琼

联系电话: 029-83395340

E-MAIL: kangqiong@mail.xjtu.edu.cn

会议网站: <http://xiansymposium.com/>

会议名称(中文): 中国生态学会 2013 年学术年会

开始日期: 2013-10-18

结束日期: 2013-10-20

所在城市: 江西省 南昌市

主办单位: 中国生态学会

承办单位: 江西农业大学

联系人: 宋爱云 施茜

联系电话: (010)62849101 62849113

E-MAIL: esc2013@rcees.ac.cn

会议网站: <http://www.esc.org.cn/n12785215/n12785472/14513300.html>