

丝孢酵母脂肪酶的酶学性质和化学修饰*

宋欣^{1**} 亓小宇² 曲音波¹

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100) (山东建筑大学市政与环境工程学院 济南 250101)

摘要 实验室筛选到的一株丝孢酵母 *Trichosporon* sp. 脂肪酶经过硫酸铵沉淀和一系列的层析步骤分离纯化到电泳纯。对纯酶的酶学性质研究表明,此酶的分子量为 28 kD, pI 为 pH 8.7,最适作用温度 40℃,最适作用 pH 为 8.0。随后利用不同的化学修饰剂对酶蛋白进行修饰,通过酶催化活力的改变对位于酶活性位的氨基酸残基进行分析,结果表明酶活性位可能含有组氨酸、丝氨酸和谷氨酸(或天冬氨酸)。最后,对此酶的氨基酸成分进行了分析,结果表明,此酶分子中天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸含量高,两种碱性氨基酸精氨酸、赖氨酸及组氨酸的含量也比较高,而脯氨酸、色氨酸的含量相对较低。

关键词 丝孢酵母脂肪酶,酶学性质,氨基酸组成,化学修饰

中图分类号:Q55 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0723-04

Properties and Chemical Modification of Lipase from *Trichosporon* sp.*

SONG Xin^{1**} QI Xiao-Yu² QU Yin-Bo¹

(State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100)

(School of Public works and Environmental engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101)

Abstract A lipase from *Trichosporon* sp. screened by my lab was purified to homogeneity by ammonia sulphate precipitation and a series of chromatographic steps. The properties of purified *Trichosporon* sp. Lipase were investigated. Its Molecular weight and isoelectric point were 28kD and pH 8.7, the optimum temperature and pH were 40°C and pH 8.0. Several chemical modification agents were applied to investigate amino acid residues in active site of this enzyme and the results demonstrated that histidine, serine, glutamic acid/asparaginic acid are located in the active site.

The composition of amino acid of the enzyme was also analyzed which indicated that the contents of asparaginic acid, serine, glutamic acid, glycine, alanine are the most, lysine, histidine also have high contents and there are a few proline, tryptophan.

Key words *Trichosporon* sp. Lipase, Properties of enzyme, Composition of amino acid, Chemical modification

近年来,有关脂肪酶分子水平上的研究有了很大进展。迄今为止,已克隆了包括微生物和动植物脂肪酶在内的许多脂肪酶基因,测定了它们的核苷酸序列,确定了它们的氨基酸一级结构^[1-3]。不同微生物脂肪酶的分子量差别极大,从 15 kD ~ 360 kD 不等,等电点大多在 pH 3.7 ~ 9.7 之间^[4-6]。另外,即使同一菌株也会产生多种脂肪酶(即同工酶),它们的分子量差别可能很大,且等电点也会出现较大差别^[7-8]。Antonian^[9]采用高压液相层析(凝胶色谱)分离德氏根霉脂肪酶,发现在 SDS-聚丙烯酰胺双向凝胶电泳上存在 10 种酶蛋白,它们的分子量均为 38900D,等电点范围在 pH 4.6 ~ 7.0。Hofelmann^[10]等从黑曲霉 *Aspergillus niger* 发酵液中分离和纯

化到了两个脂肪酶同工酶(I 和 II),它们的相对分子质量分别为 31 kD 和 19 kD,等电点分别为 pH 4.0 和 pH 3.5,酶学性质也各不相同。Huge-Jensen^[11]等从米赫根毛霉 *Rhizomucor miehei* 中分离出两种具有脂肪酶活性的糖蛋白,它们的糖基化程度不相同。两种形式的酶具有类似的氨基酸组成,并具有相同的一级结构,是来源于根毛霉的同一脂肪酶基因,只是以后的蛋白质加工或糖基化作用有所不同,导致了某些性质的改变。由此看来脂肪酶分子的分子量、等电点以及各种酶组分之间都存在着一定的联系,要探讨这种联系就需要将酶分离纯化,并对其酶学性质和酶分子的氨基酸组成等进行研究,以便更好地了解脂肪酶的一级序列和三维结构,从而

* 山东科技发展计划资助(No. 032040107)

** 通讯作者 Tel: 0531-88361379, Fax: 0531-88565610, E-mail: songx@sdu.edu.cn

收稿日期:2006-12-06,修回日期:2007-02-12

搞清楚脂肪酶在水解和合成反应过程中的催化作用机制及特殊结构和功能间的关系。

对脂肪酶活性中心的研究发现, Ser-Asp-His 组成了有催化作用的三联体, 人胰脂肪酶(HPL)、米赫根毛霉 *Rhizomucor miehei* 脂肪酶(RML)的立体结构也证明了这种三联体的存在^[12]。地霉 *Geotrichum* sp. 脂肪酶三联体稍有不同, 是 Ser-Glu-His, 即 Glu 取代了 Asp。上述 3 种脂肪酶中, 活性中心丝氨酸残基的侧链构象在空间结构方面与丝氨酸蛋白酶的非常相似, 所不同的是脂肪酶的活性中心隐藏在酶蛋白分子内部。脂肪酶的活性中心是丝氨酸残基, 在正常情况下 HPL、RML 的活性中心被亲水性的短 α -螺旋覆盖, 而 *Geotrichum* sp. 脂肪酶的活性中心被两个平行的 α -螺旋覆盖^[13-14]。关于丝孢酵母脂肪酶活性中心结构, 未见文献报导, 本论文主要对丝孢酵母 *Trichospora* sp. Y-11 碱性脂肪酶经纯化后的酶学性质及活性位点的化学修饰进行了研究。

1 材料与试剂

1.1 仪器

Hitachi 55P-72 高速冷冻离心机, Kelvinator 冷藏层析柜, Pharmacia 多功能电泳仪, 上海瑞丽分离仪器厂的超滤器, Pharmacia 层析系统, 美国 FTS 冷冻干燥仪, 德国 EUPA 高速匀浆器, 德国 CERTOMAT 水浴振荡器。

1.2 试剂

Biogel P-3, Biogel P-10, DEAE-Sephadex A-50, CM-Sephadex C-50, Sephadex G-25, 牛血清白蛋白, SDS, 低分子量标准蛋白(分子量范围 14400-94700), 两性电解质载体(pH 3.5-10)均为 Sigma 产品, 橄榄油为西班牙进口分装。

1.3 培养基

菌种为实验室筛选到的丝孢酵母 *Trichosporon* sp. Y-11。

1.3.1 富集培养基(g/L): 酵母膏 2.0, 橄榄油 5.0, K_2HPO_4 1.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, NaCl 0.5, pH 6.0, pH 7.5 和 pH 9.5

1.3.2 平板初筛培养基(g/L): $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, K_2HPO_4 1.0, KCl 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, 琼脂 15~20, pH 9.5, 中性红(指示剂) 5 滴, 80 kPa 灭菌 30min。

取橄榄油与 20g/L 聚乙烯醇以 1:3 的比例混合, 用高速搅拌机搅拌乳化 6min, 灭菌后取 12mL 加入到 100mL 上述培养基中, 即为初筛培养基。

附中性红变色范围 9.6→8.0, 黄色→红色

1.3.3 复筛培养基(g/L): 黄豆粉 20, 玉米浆 20, 蔗糖 10, 橄榄油 10, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, K_2HPO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, pH 6.0, 80 kPa 灭菌 30min。

2 方法

2.1 脂肪酶活力测定

按照 Yamada 等人^[15]的橄榄油底物乳化法进行测定。在 40℃, pH 8.0 对橄榄油底物水解反应 10min, 每分钟产生 1 μ mol 脂肪酸所需的酶量定义为一个单位(U)。

2.2 蛋白质含量测定

参照 Lowry 等人^[16]的 Folin-酚法测定, 以牛血清蛋白为标准蛋白。

2.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

按 Weber 等人^[17]的方法进行。分离胶浓度 7.5%, 浓缩胶浓度 3%。

2.4 酶的分离提纯

2.4.1 蛋白质溶液的浓缩、除盐: 稀溶液的浓缩采用截留分子量 5000 的超滤膜进行超滤或进行冷冻干燥。除盐采用 Sephadex G-25 层析法或利用截留分子量为 10000 D 的透析袋透析除盐。

2.4.2 硫酸铵沉淀: 在丝孢酵母 Y-11 经离心除去菌体的粗酶液中加入硫酸铵至 10% 饱和度, 静置至出现沉淀, 5000r/min 离心 20min 弃沉淀, 向上清液里继续加入硫酸铵至 45% 饱和度, 静置过夜, 8000 r/min 离心 20min 收集沉淀。

2.4.3 Sephadex G-25 层析除盐: 将上一步得到的沉淀用少量蒸馏水溶解后, 上 Sephadex G-25 柱(2.6 cm (30 cm), 以 pH 8.0 0.02 mol/L 磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液洗脱(在 280nm 处用紫外检测仪进行检测), 收集蛋白峰并浓缩。

2.4.4 Bio-gel P-30 层析: 将从经 G-25 除盐后的酶液经浓缩后上 Bio-gel P-30 柱(2.6cm × 100 cm), 以 pH 8.0 的 0.02 磷酸盐缓冲液洗脱, 合并含有脂肪酶酶活的洗脱液, 并超滤浓缩。

2.4.5 DEAE-Sephadex A-50 层析: 将上一步洗脱下来的含酶组分经过超滤浓缩后, 再用 pH 9.0 的浓

Tris-HCl 缓冲液调至洗脱 pH 值,上 DEAE-Sephadex A-50 柱(26cm × 20 cm)上,以 pH 9.0 的 0.01mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱,并在洗脱达 1 个柱体积(大约 115mL)时,用含有 0.2NaCl 的同样缓冲液进行洗脱,收集有酶活的洗脱液,进行浓缩。

2.4.6 CM-Sephadex C-50 层析:将上述浓缩后的洗脱液加样到 CM(Sephadex C-50 柱(2.6cm × 20 cm)上,以含有 NaCl 的 pH 6.4 的 0.02 磷酸盐缓冲液洗脱,NaCl 浓度梯度为 0mol/L ~ 0.8mol/L。收集具酶活的洗脱液并浓缩。

2.4.7 Biogel-gel P-10 层析:将酶液加到 Biogel-gel P-10(1.6cm × 100 cm)柱上,以 pH 8.5 的 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱,收集并浓缩具酶活的洗脱液。

以上每一步层析后都用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

2.5 最适反应条件测定

分别改变反应的温度或 pH 值,按照标准酶活测定方法进行测定。

2.6 酶的热稳定性和 pH 稳定性测定

将酶液分别在 40℃、50℃、60℃、70℃ 水浴中保温,每隔一定时间取样,冰浴冷却,然后按照标准酶活测定法测定。

将酶液与不同 pH 缓冲液以一定比例混合,4℃ 冰箱放置过夜后,将酶液的 pH 调至最适反应 pH,然后按上述方法测定脂肪酶活力。

3 结果

3.1 菌种鉴定

3.1.1 液体培养特征:麦芽汁培养基 28℃ 静置培养 48h,培养液较清,液面上形成一层醭膜,没有气泡不发酵。

3.1.2 菌落形态:麦芽汁平板接种,28℃,7d,菌落白色,较大,表面平燥,有放射性菌丝线,边缘呈细微毛边,20℃,15d 后菌落长满平板。

3.1.3 个体形态:马铃薯固体培养基划线接种后,斜插入一盖片,28℃ 培养 5d,显微镜下观察盖片上菌丝形态,有较长的真菌丝,菌丝有隔膜,在菌丝的末尾一端有许多横隔膜,把菌丝切成条砖形,断裂成单个细胞,排列成一左倾一右倾的细胞断链,即成节孢子,亦有芽殖,为多边芽殖。无八叠式细胞群。

3.1.4 孢子鉴定:不形成子囊孢子,不形成掷孢子,也不形成冬孢子及担孢子,显微镜下观察有大量节

孢子,也有少量厚壁孢子。节孢子经电镜观察大小为 20μm ~ 70μm × 30μm。

由以上特征,据《酵母菌分类学》(王利编,1984 年版),可知该菌为真菌门,半知菌亚纲,从梗孢目,隐球酵母种,丝孢酵母属(*Trichosporon*)。

3.2 酶的分离纯化

3.2.1 Sephadex P-30 层析:经过硫酸铵沉淀已经除去大量的杂蛋白的酶液在经 Sephadex G-25 除盐后过 Biogel P-30 凝胶柱。这一步可除去绝大部分大分子量蛋白,但是分子量在 40000D 以内的小分子量的杂蛋白及色素和所需要的脂肪酶蛋白峰仍无法分开。经过这一步层析,酶蛋白被纯化了 4.58 倍。

3.2.2 DEAE-Sephadex A-50 层析:用 DEAE-Sephadex A-50 进行层析时,在 pH 8.0 时,酶组分为穿过峰,在 pH 9.0 时,酶液能够被吸附到柱上,表明酶蛋白的等电点在 pH 8.0 和 9.0 之间。将酶液在 pH 9.0 时进行层析,下限缓冲液为 0.01mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液,上限为含 0.2mol/L NaCl 的同样缓冲液。在洗脱体积为 190mL ~ 220mL 时,当盐浓度为 0.1mol/L 时,就可将酶组分洗脱下来。

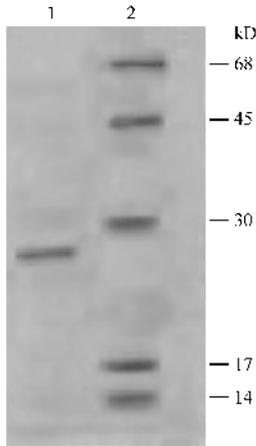
3.2.3 CM-Sephadex C-50 层析:上步得到的酶液经此步层析后可得到两种蛋白的等电点和分子量都比较相近的蛋白质,含酶组分在洗脱体积为 190mL ~ 230mL 的位置出现,此时 NaCl 的浓度大约为 0.5mol/L。

3.2.4 Biogel P-10 层析:上步酶液经此分子筛层析后,可出现两个完全分开的蛋白吸收峰,其中一个峰具有脂肪酶活性,初步表明此 Y-11 脂肪酶已被纯化。

3.2.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:将经上述多次层析得到的洗脱液经冷冻干燥成酶粉,然后进行 SDS-PAGE 及等电聚焦电泳(IEF)检验,呈现单一的蛋白带,证明此酶已达到电泳纯(图 1)。并通过计算,得知此酶的分子量为 28 kD。经等电聚焦电泳得知 pI 为 pH 8.7。

3.3 化学修饰剂对酶活力的影响

利用一些化学修饰剂对酶蛋白进行修饰,通过酶催化活力的改变对酶活力中心的氨基酸组成进行分析。由表 1 可知,NBS、PDP、NBSF、Glyoxal 对 Y-11 脂肪酶的活力影响不大,而修饰组氨酸的 DEPC、修饰丝氨酸的 PMSF 和修饰两种酸性氨基酸谷氨酸和天冬氨酸的 WRK 使酶完全失活,表明酶活力中心可能含有组氨酸、丝氨酸和谷氨酸(或天冬氨酸)。

图1 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶的 SDS-PAGE 电泳图谱表1 化学修饰剂对 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶活力的影响

被修饰的氨基酸残基	化学修饰剂	浓度 (mmol/L)	缓冲液 (50mmol/L)	时间 (min)	相对酶活 (%)
无	无		KPB pH8.0	10	100
Try	NBS	0.01	醋酸缓冲液 pH4.0	10	85
His	DEPC	10	KPB pH 6.8 ~ 8.0	10	0
Ser	PMSF	10	KPB pH7.0	10	0
Lys	PDP	10	KPB pH7.0	10	100
Glu/Asp	WRK	60	KPB pH6.5	10	2
Tyr	NBSF	10	KPB pH8.0 以上	10	98
Arg	Glyoxal	20	硼酸缓冲液 pH8.5	10	97

3.4 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶的氨基酸组成

于不同时间将 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶水解后,应用氨基酸自动分析仪测得的结果经外推法计算可得酶组分的氨基酸组成见表2。

表2 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶的氨基酸组成

氨基酸	残基数/mol 酶	残基百分含量
ASP	32	12.17
THR	8	3.04
SER	31	11.79
GLU	25	9.51
GLY	20	7.60
ALA	28	10.65
CYS	11	4.18
VAL	32	12.17
ILE	10	3.80
LEU	5	1.90
TRY	4	1.52
TYR	6	2.28
PHE	5	1.90
LYS	15	5.70
HIS	16	6.09
ARG	12	4.56
PRO	3	1.14

4 小结

在酶的纯化过程中,经前几步的纯化首先除去分子量及等电点与所要得到的酶组分差别较大的杂蛋白,于最后一步将分子量及等电点相近的两种蛋白用分辨率较高的 Biogel P-10 来进行层析,这样才将 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶纯化到电泳纯。

用化学修饰剂对 *Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶的酶活性中心的修饰结果表明,如同大多数脂肪酶分子一样,*Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶的酶的活性中心可能也含有组氨酸,丝氨酸和谷氨酸(或天冬氨酸)组成的三联体。

从许多酶的氨基酸组成来看,等电点的高低以及耐碱性的强弱与其碱性氨基酸的含量并无直接的关系。*丝孢酵母 Trichosporon* sp. Y-11 脂肪酶分子中的天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸含量高,两种碱性氨基酸精氨酸、赖氨酸及组氨酸的含量也比较高,而脯氨酸、色氨酸的含量相对较低。从此酶的酶学性质来看,在碱性条件下较稳定,这和其分子中碱性氨基酸的组成和含量应该存在一定的内在联系,还有待于进一步的研究结果证明。

参考文献

- [1] Baillargeon M W. *Lipids*, 1990, **25**: 841 ~ 848.
- [2] Jaeger K E, Dijkstra BW, Reetz M T. *Annu Rev Microbiol*, 1999, **53**: 315 ~ 351.
- [3] Erik B, Hans P M, Rüdiger B, *et al.* *Microbiology and Virology*, 2005, **22**(7): 523 ~ 535.
- [4] Omar I C, Nishio N, Nagai S. *liquor medium Agric Biol Chem*, 1987, **51**: 2145 ~ 2151.
- [5] Veeraragavan K, Gibbs B F. *Biotechnol Letters*, 1989, 345 ~ 348.
- [6] Veeraragavan K, Colpitts T, Gibbs B F. *Biophys Acta*, 1990, **1044**(1): 23 ~ 26.
- [7] Sugiura M, Oikawa T. *Biophys Acta*, 1977, **489**(2): 262 ~ 268.
- [8] Iisobe M, Sugiura M. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1977, **25**(8): 1980 ~ 1986.
- [9] Antonian E. *Lipids*, 1988, **23**(12): 1101 ~ 1106.
- [10] Hofelmann M, Hartmann J, Zink A, *et al.* *J Food Sci*, 2000, **50**: 1721 ~ 1731.
- [11] Hüge-Jensen B, Andreassen F, Christensen T, *et al.* *Lipids*, 1989, **24**: 781 ~ 785.
- [12] Brady L, Brzozowski A M, Derewenda Z S, *et al.* *Nature*, 1990, **343**: 767 ~ 770.
- [13] Schrag J D, Li Y G, Wu Shan, *et al.* *Nature*, 1991, **351**: 761 ~ 764.
- [14] Rubingh D N *Curr Opin Biotech.* 1997, **8**: 417 ~ 422.
- [15] Yamada K, Ota Y, Machida H *J Agr. Chem Soc Japan*, 1962, **36**: 860 ~ 864.
- [16] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, *et al.* *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265 ~ 275.
- [17] Weber K, Pringl E J R, Osborn M. *Enzymol*, 1971, **26**: 3 ~ 27.