

嗜冷枯草芽孢杆菌低温脂肪酶纯化与酶学性质研究*

胡泊¹ 吴胜² 杨柳² 郑国钧^{1**} 孙万儒²

(北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029) (中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100101)

摘要 :从筛选出的产低温脂肪酶的菌株发酵液中,经硫酸铵沉淀、疏水色谱和阴离子交换色谱纯化得到电泳纯酶。酶的最适作用温度为 25℃,0℃以下仍可保持 25%左右的相对酶活,在 pH5.8~8.8 的范围内有较高活力,其最适作用 pH 为 7.8,对热很敏感,在 60℃保温 30min 活性即全部丧失,具有典型的低温脂肪酶特征,酶催化不需要金属离子的参与,结构中可能含有二硫键。在 25℃,pH8.0 测得酶水解反应的 K_m 值为 2.65×10^{-5} mol/L, V_{max} 值为 5.21mmol/(L·min)。

关键词 :低温脂肪酶 纯化 酶学性质

中图分类号 :Q3 文献标识码 :A 文章编号 :0253-2654(2007)03-0524-04

Purification and Enzymatic Characters of Low-temperature Lipase from *Bacillus phychrophilus* *

HU Bo¹ WU Sheng² YANG Liu² ZHENG Guo-Jun^{1**} SUN Wan-Ru²

(College of Life Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029)

(State Key Laboratory of Microbiology Resources Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract :This study involves purification of a wild low-temperature lipase from a strain of *Bacillus phychrophilus* and analysis of its enzymatic characters. Electrophoretic pure enzyme on the SDS-PAGE was obtained through ammonium sulfate precipitation, phenyl superpose hydrophobic chromatography and Q FF anion-exchange chromatography. The optimum temperature of the enzyme is 25℃, which still has 25% relative lipase activity at 0℃. The activity of the lipase almost completely lost after incubation at 60℃ for 30 min. Lipase activity is independent of divalent cation. And the structure of this lipase may contain disulfide bond. The K_m and V_{max} of lipase under pH8.0 and 25℃ were 2.65×10^{-5} mol/L and 5.21mmol/(L·min) respectively.

Key words :Low-temperature lipase, Purification, Enzymatic characters

脂肪酶能够催化脂类化合物的水解,合成和脂交换,具有高度的位点选择性和立体选择性^[1]。是一种重要的工业酶类。广泛应用于油脂水解、食品风味和香味改进、医药生产、皮革绢纺脱脂、低等油脂改性和作为洗涤剂与化妆品的添加剂等^[2]。近年来低温脂肪酶的发现,更是为该酶的用途提供了广阔的空间。

同中温脂肪酶相比,低温脂肪酶在低温下仍然可以保持相当高的活力。Arpigny^[3]等的研究表明,静止嗜冷杆菌(*Psychrobacter immobilis*)B10 所产生的低温脂肪酶在 0℃时仍保留酶活的 20%左右。低

温脂肪酶的主要特征是低温条件下具有较高的转化系数 K_{cat} 及生理系数 K_{cat}/K_m 和较低的热稳定性^[4],因此广泛应用于皮革、造纸等行业中,可减少加热和冷却的步骤,节约能源,保护环境。同时在食品、啤酒等工业中,低温脂肪酶在较低温度下很快失活,避免了长时间高温灭活而影响食品、啤酒的质量与风味。

目前国内对低温脂肪酶研究甚少,仅有中国海洋大学^[5]等几所科研单位有过报道,*Bacillus* 属所产低温脂肪酶的研究尚未有文献报道。本文对低温脂肪酶进行了纯化,并对其酶学性质进行了初步研

* 基金项目 :国家 973 项目(No. 2004CB719606);微生物资源国家重点实验室开放项目(No. 041014)

** 通讯作者 Tel 010-64437507, E-mail :zhenggj@mail.buct.edu.cn

收稿日期 :2006-09-05,修回日期 2006-10-16

究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 :嗜冷枯草芽孢杆菌(*Bacillus phychrophilus*)由中科院微生物所王建军提供。

1.1.2 主要仪器和试剂 :丁酸对硝基苯酚酯(p-NPB)、牛血清蛋白(BSA)、标准 lipase 均购自 Sigma 公司,蛋白电泳 Marker(中国科学院生物化学所)、其它化学试剂均为国产分析纯。UV-2201 型紫外-可见分光光度计(日本 SHIMADZU 公司)、Hiprep™ 16/10 型疏水层析柱和 Hiprep™ 16/10 型 Q FF 阴离子交换柱(美国 Amersham Biosciences 公司)、FPLC(美国 Amasham Pharmacia biotech 公司)。

1.1.3 培养基组成 :普通 LB 培养基 :每 L 含 10g 胰化蛋白胨、5g 酵母提取物、5g 氯化钠。

1.1.4 发酵条件 :30℃ 下、220r/min 摇床培养 48h。

1.2 蛋白质浓度的测定

考马斯亮蓝法进行测定^[6],以 BSA 为标准蛋白。

1.3 脂肪酶活性的测定方法

500μL 的反应体系中含有 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液、100μmol/L 的丁酸对硝基苯酚酯(p-NPB)底物溶液和酶溶液(0.1mg/mL ~ 20mg/mL)。底物溶于 5mL 乙腈中,加入 20mL 异丙醇,缓缓加入 475mL 50mmol/L、pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配成反应液。每 900μL 反应液加入 100μL 粗酶液,在 25℃ 保温 10min 后,加入 1mL 无水乙醇中止反应。在实验条件下,每分钟生成 1μmol 对硝基苯酚为一个活力单位,对硝基苯酚的测定采用分光光度法^[7]。

1.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

Laemmli 法进行^[8],分离胶浓度为 12%、积层胶浓度为 5%、20mA 不连续垂直板电泳电泳 5h 左右。考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.5 硫酸沉淀法纯化蛋白

摇瓶培养 48h 后的菌液 4℃、5000r/min 离心 20min,取上清液 200mL 放置冰水浴上,收集硫酸饱和度和 40% ~ 60% 之间沉淀下来的蛋白,用 40mL 50mmol/L Tris-HCl 溶解后放 -20℃ 冰箱中储存。

1.6 疏水色谱

配制溶液 A(50mmol/L、pH8.0 Tris-HCl +

1mmol/L DTT + 1mol/L (NH₄)₂SO₄)和溶液 B(50mmol/L Tris-HCl(pH8.0)+ 1mmol/L DTT)、用 0.45μm 的滤膜滤过,取硫酸铵透析液经 0.45μm 滤膜滤过取 10mL 上样。用溶液 A 洗脱三个柱体积(60mL)后,改用增加溶液 B 的洗脱梯度洗脱,流率为 2mL/min,用 UV₂₈₀ 进行检测,收集峰值洗脱液,检测脂肪酶活力,将有活力的样品管放 -20℃ 冷冻保存。

1.7 阴离子交换柱纯化蛋白质样品

配制溶液 A(50mmol/L、pH8.0 Tris-HCl + 1mmol/L DTT)和溶液 B(50mmol/L、pH8.0 Tris-HCl + 1mmol/L DTT + 1mol/L NaCl)、用 0.45μm 的滤膜滤过,取经疏水色谱处理并透析除盐过的粗酶液,0.45μm 滤膜滤过后上样 10mL,用溶液 A 洗脱 3 个柱体积后,改用溶液 B 的洗脱梯度洗脱,流率为 2mL/min,用 UV₂₈₀ 检测,收集峰值洗脱液,检测脂肪酶活力,将有活力的样品脱盐后放 -20℃ 冷冻保存。

2 结果

2.1 低温脂肪酶的分离纯化

发酵上清液经过硫酸铵沉淀、Phenyl Superose 疏水柱色谱和 QFF 阴离子交换色谱 3 步纯化,获得 PAGE 电泳纯的酶,原上清液蛋白总含量为 31.4mg,总酶活为 6820U,纯化后蛋白总含量为 0.785mg,总酶活为 1821U,纯化倍数为 10.7 倍。结果见表 1, SDS-PAGE 电泳图谱见图 1。

表 1 脂肪酶纯化结果图

纯化步骤	蛋白含量/ mg	酶活/ U	活性回收 率/%	蛋白回收 率/%	纯化 倍数
上清液	31.4	682	100	100	1
疏水色谱	4.31	478	70.1	13.7	5.12
阴离子交换	0.785	182	26.7	2.5	10.7

上清液经硫酸沉淀、疏水层析、阴离子交换柱纯化后,SDS-PAGE 电泳显示为一条带,纯化后的低温脂肪酶分子量为 60kD 左右。

2.2 低温脂肪酶的性质

2.2.1 不同温度下脂肪酶活力 :丁酸对硝基苯酚酯底物溶液置于 0℃ ~ 60℃ 不同温度下保温 30min,加入酶液反应 10min,按标准测定方法测定酶活,结果如图 2 所示。

脂肪酶的最适温度为 25℃ 左右,在 0℃ 左右仍能保持 20% 左右的活力,30℃ 以上酶活下降速度很

快。从这些特征中可以看出该酶是一株典型的低温脂肪酶^[9],其在高温下活力丧失很快。

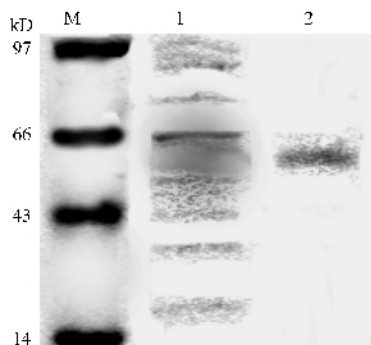


图1 纯化脂肪酶的 SDS-PAGE 电泳图

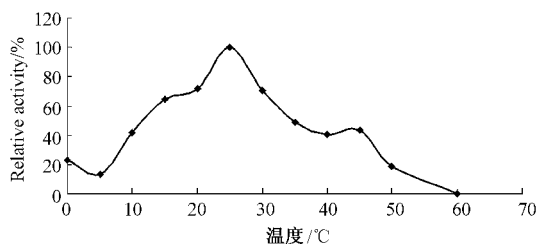


图2 温度对酶活力的影响

2.2.2 温度对脂肪酶稳定性的影响: 50mmol/L 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 1U 的酶液,在不同温度下分别温浴 15min, 30min, 45min, 60min, 75min, 90min, 加入底物反应液,按标准方法测定同一温度下不同时间点的酶活,绘制曲线,如图 3 所示。可以看出,在 25°C 和 35°C 下,脂肪酶活力随时间丧失较慢,1h 后仍能保留 80% 以上活力,而在 50°C,活力很快丧失,1h 后保留酶活不足 50%。该酶在较低温度下可保持较高活力,较高温度下活力很容易丧失,符合低温脂肪酶的基本特征。

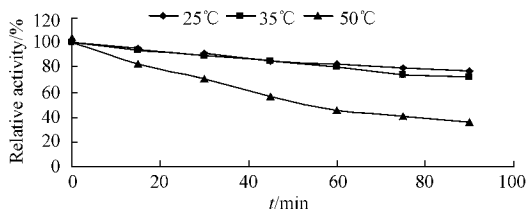


图3 温度对脂肪酶稳定性的影响

2.2.3 不同 pH 下脂肪酶活力: 用 pH 值 5.8~8.2 的磷酸缓冲液和 pH 值 6.9~9.1 的 Tris-HCl 缓冲液为反应体系,25°C 进行酶反应,用标准酶活测定方法进行酶活测定,结果如图 4 所示。该酶属于弱碱性脂肪酶,在磷酸缓冲液中其最适 pH 为 7.8;而在 Tris-HCl 缓冲液中最适 pH 为 8.8;在酸性条件下,脂

肪酶活力丧失很快,至 pH 为 5.8 时,脂肪酶活力降至 20% 以下。与 Tris-HCl 缓冲液相比,磷酸缓冲液更适宜酶促反应,对于磷酸缓冲液体系,pH 值在 7.8 左右相对比较稳定,而在 pH 值低于 7.4 以后,相对活力随 pH 值变化较大。Tris-HCl 缓冲液中酶活受 pH 影响较大,最高酶活出现在 pH8.8 左右。

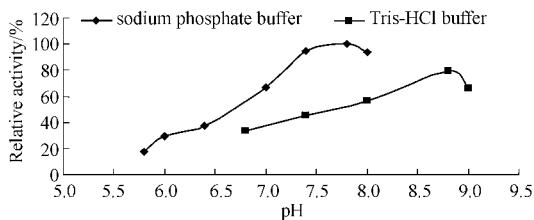


图4 pH 值对脂肪酶活力的影响

2.2.4 pH 对脂肪酶稳定性的影响: 不同 pH 的磷酸缓冲液中加入 1U 酶液,25°C 分别温浴 15min, 30min, 45min, 60min, 75min, 90min 后,按标准方法测定脂肪酶活力,绘成曲线,如图 5 所示,该酶在 pH7.8、pH8.0 时酶活下降较慢,而在 pH6.0 时迅速下降,结合图 4 验证了该酶是弱碱性脂肪酶。

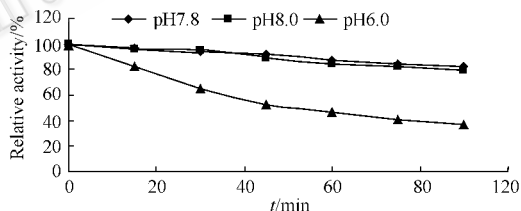


图5 pH 对脂肪酶稳定性的影响

2.2.5 不同金属离子对脂肪酶活力的影响: 50mmol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液中加入 2mmol/L 的不同金属离子或化学试剂,加入 1U 的酶液,25°C 温浴 30min,按标准方法测定酶活,结果如表 2 所示,还原剂 DTT 对脂肪酶活力影响很大,说明其中可能含有二硫键。 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Sn^{2+} 对该酶活影响不大,而 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 能强烈地抑制酶活,可能是由于这些离子与酶活性中心的巯基基团相结合,进而引起酶失活。 Zn^{2+} 、 Al^{3+} 对脂肪酶活力影响不大。EDTA 对酶的活力影响很小,表明酶在结构和功能上不需要金属离子作为辅因子。

2.2.6 低温脂肪酶 V_{max} 和 K_m 的测定: 以丁酸对硝基苯酚酯为底物,25°C 进行脂肪酶水解反应,以底物浓度倒数为横坐标,反应初速率的倒数为纵坐标作图,由图 6 得出该脂肪酶的

$$K_m = 2.65 \times 10^{-2} \text{ mmol/L}, V_{max} = 5.21 \text{ mmol/(L} \cdot \text{min)}$$

表 2 金属离子对脂肪酶活力的影响

Agents	Relative activity (%)
No addition (control)	100.0
+ 2mmol/L Mg^{2+}	94.4
+ 2mmol/L Cu^{2+}	58.5
+ 2mmol/L Co^{2+}	97.0
+ 2mmol/L Mn^{2+}	41.9
+ 2mmol/L Zn^{2+}	74.1
+ 2mmol/L Al^{3+}	74.7
+ 2mmol/L Sn^{2+}	93.9
+ 2mmol/L EDTA	100.0
+ 1mmol/L DTT	40.8

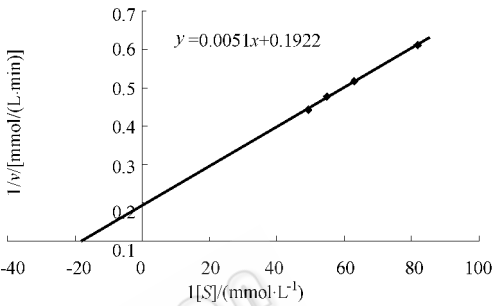


图 6 双倒数酶动力学曲线

迅速下降 ,有利于该酶的工业应用 ,但是与工业上普遍应用的脂肪酶相比 ,酶活较低 ,分析可能是纯化过程酶活损失较大。

参考文献

[1] Malmos H. Chemistry and Industry ,1990 5 :13 ~ 16.
[2] 彭立凤 ,赵汝淇 ,谭天伟 .食品与发酵工业 ,2000 26(3) :68 ~ 69.
[3] Arpigny J L , Lamotte J , Gerday ch , et al . Journal of Molecular Analysis B , Enzymatic ,1997 3 29 ~ 35.
[4] Feller G. Microbiology Letters ,1990 66 :239 ~ 244.
[5] 林学政 ,杨秀霞 ,等 .海洋学报 ,2005 27(3) :154 ~ 158.
[7] Bradford MW. Anal Biochem ,1976 72 :248 ~ 254.
[8] 高 贵 ,韩四平 ,王 智 ,等 .药物生物技术 ,2002 9(5) :281 ~ 284.
[9] Laemmli U K. Nature ,1970 ,227 :680 ~ 685.
[10] 史贤俊 ,林 影 .生命的化学 ,2001 21(3) :248 ~ 249.

3 讨论

本实验利用中科院微生物所提供的适冷菌株 ,对其所产低温脂肪酶进行了纯化 ,并对其酶学性质进行了一些初步研究。由于实验所纯化酶量较小 ,所以采用了丁酸对硝基苯酚酯为底物的酶活测定方法 ,与常用的滴定法相比 ,该法用量小 ,灵敏度高。

酶学性质证明该酶是典型的低温弱碱性脂肪酶 ,在 0℃ 依然可以保持 25% 左右的活力 ,与先前国内文献所报道的低温脂肪酶相比 ,低温时活力更高。实验证明该酶在较高温度 ,例如 50℃ 下酶活会