Geotrichum sp. SYBC WU－3 脂肪酶的双水相萃取和酶学性质

王　蕾[1,2],蔡宇杰[1],廖祥儒[1],张　峰[1],张大兵[3]

(1. 江南大学　生物工程学院　工业生物技术教育部重点实验室,无锡 214122;
2. 内蒙古科技大学　生物与化学工程学院,包头 014010;
3. 江苏汉邦科技有限公司,淮安 223001)

摘　要:初步研究双水相体系对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的萃取分离效果,选用 PEG4000/ NaH_2PO_4 作为成相系统进行系统研究,考察影响脂肪酶萃取的各种因素(如 PEG 相对分子质量及质量分数、NaH_2PO_4 质量浓度、pH),并采用正交实验进一步优化实验条件,确定双水相萃取体系为 PEG 质量分数为 30%、NaH_2PO_4 质量分数为 20%、体系 pH 为 6,在此条件下 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶经硫酸铵沉淀和双水相萃取两步纯化的纯化倍数达到最大,较 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶粗酶纯化了 22 倍。*Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶为低温碱性脂肪酶,最适反应温度为 15 ℃,最适 pH 为 9.5,相对分子质量为 3.58×10^4。

关键词:双水相;酶学性质;*Geotrichum* sp.;脂肪酶;萃取

中图分类号:TQ925$^+$.6　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1672－3678(2009)02－0057－06

Aqueous two-phase extraction of lipase produced by *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 and characterization of enzyme

WANG Lei[1,2], CAI Yu-jie[1], LIAO Xiang-ru[1], ZHANG Feng[1], ZHANG Da-bing[3]

(1. School of Biotechnology, Educational Ministry Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. School of Biological and Chemical Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China;
3. Jiang Su Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huai'an 223001, China)

Abstract: Aqueous two-phase system composed of PEG4000/NaH_2PO_4 was evaluated in the extraction of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 lipase. Factors of molecular weight, concentration of PEG, concentration of NaH_2PO_4, and pH on the lipase were investigated. The optimized conditions by orthogonal test design was as follows: PEG concentration of 30%, NaH_2PO_4 concentration of 20%, pH 6. At these conditions, the activity of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 lipase was 22 times of the crude product. The lipase was a low-adapted alkaline lipase, the optimum temperature was 15 ℃, the optimum pH was 9.5, and the molecular weight was 3.58×10^4.

Key words: aqueous two-phase system; enzyme property; *Geotrichum* sp.; lipase; extraction

---

收稿日期:2008－07－17

基金项目:江南大学人才引进基金资助项目(006626)

作者简介:王　蕾(1981—),女,内蒙古包头人,硕士研究生,研究方向:生物大分子结构功能;廖祥儒(联系人),教授,博士生导师,E-mail:liaoxiangru@163.com

脂肪酶(lipase,EC 3.1.1.3),在甘油酯及水不溶性酯类的水解、醇解、酯化、酯交换以及合成等反应不需要辅酶,反应条件温和,副产物少,在油脂加工业、食品加工与饲料业、精细化工业、医药业、造纸业、化妆业和生物柴油等领域有着广泛应用[1]。随着催化反应对纯脂肪酶需求的日益增加,酶制品的大规模分离纯化成为当前生物工程中的关键技术问题。

双水相萃取(ATPS)提取蛋白质是近些年来发展起来的技术,与一些传统的分离方法相比,ATPS具有条件温和、产品活性损失小、处理量大、分离步骤少、无有机溶剂残留、设备投资小、操作简单、易于工程放大和连续操作等优点,非常适合大规模应用[2-3]。该技术已成功地应用于几十种胞内酶的提取和精制。在生化工程中,常用的双水相体系有聚乙二醇/葡聚糖体系和聚乙二醇/磷酸盐体系,后者由于成本低廉且选择性较高,应用更为广泛。闫云君等[4]和王俊华等[5]利用双水相萃取技术对不同来源的脂肪酶进行分离纯化均得到了理想的结果。

本文对筛选得到的1株产低温脂肪酶 *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 在 PEG/NaH_2PO_4 双水相体系中对脂肪酶的萃取分离效果进行系统研究,考察影响脂肪酶萃取的各种因素,并采用正交实验优化实验条件,以得到最佳萃取体系。此外,还对纯化后的 *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 脂肪酶性质进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌种

Geotrichum sp. SYBC WU-3 为江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室保藏菌株,菌种用马铃薯斜面4 ℃保存,使用前先在种子培养基中30 ℃活化24 h。

1.2 培养基

马铃薯斜面培养基(g/L):马铃薯200,蔗糖20,琼脂20。115 ℃灭菌15 min。

种子培养基(g/L):酵母膏3,葡萄糖10,麦芽汁3,蛋白胨5。pH 自然。115 ℃灭菌15 min。

摇瓶发酵培养基:蛋白胨10.0 g/L,酵母膏3.0 g/L,NaCl 3.0 g/L,橄榄油50 mL /L,聚氧乙烯辛基苯基醚(乳化剂OP)50 mL/L。自然pH。121 ℃灭菌15 min。

1.3 培养方法

种子培养:250 mL 三角瓶装50 mL 种子培养基,接入斜面菌种一环,30 ℃,180 r/min 旋转式摇床振荡培养24 h。

产酶培养:250 mL 三角瓶装50 mL 摇瓶发酵培养基,接种量为体积分数2%,30 ℃,180 r/min 旋转式摇床振荡培养72 h。

1.4 分析方法

1.4.1 双水相萃取体系

按质量配制双水相萃取体系,以10 g为萃取体系总质量,其中酶液为2 g。按照比例称取一定量的PEG和$(NH_4)_2SO_4$,质量不足部分以水补足。8 000 r/min 离心,5 min 使其充分分相。分别测定上下相的脂肪酶活力和总蛋白含量以及上下相的体积,按以下公式计算:

相比(R) = 上相体积/下相体积;分配系数(K) = 上相脂肪酶比活力/下相脂肪酶比活力;萃取率(S_f) = $RK/(1+RK)$。

1.4.2 酶活测定方法

脂肪酶活性的测定以对硝基苯丁酸酯(*p*-NPB)为底物,参考 Margesin 等[6]的测定方法并略作修改。每5 mL 测定体系含有72 mmol/L TrisHCl (pH 9.5)缓冲液,0.8 mmol/L 对硝基苯丁酸酯。30 ℃保温15 min后加入100 μL 酶液,在405 nm 下测定吸光值。利用对硝基酚的消光系数18 600 L/(mol·cm)计算对硝基酚的产生量,以1 min 内催化产生1 μmol 的对硝基酚所需的酶量为1个酶活力单位(U)。

1.4.3 发酵液蛋白含量的测定

发酵液蛋白含量的测定采用 Bradford 检测法[7]。在试管中加入0.1 mL 酶液,以100 μL 双蒸水替代相应的酶液作为对照,再加入4 mL 0.01%考马斯亮蓝 G-250 溶液,振荡摇匀。5 min 后测定595 nm 处吸光值。测定工作需在1 h 内完成。

1.4.4 SDS-PAGE 电泳

采用不连续垂直板状电泳系统进行,分离胶质量分数为15%,浓缩胶质量分数为5%,电泳缓冲液pH 为8.8。

2 结果与讨论

2.1 双水相体系的确定

2.1.1 PEG 相对分子质量对萃取效应的影响

同一系列聚合物的疏水性随相对分子质量增

加而增加,其大小的选择依赖于萃取过程的目的和方向。

分别选取相对分子质量为2 000、4 000、6 000、10 000和20 000的 PEG,质量分数均为 20%(萃取体系总质量 10 g),按照 1.4.1 配制双水相体系,分别测定 K 和 S_f(图 1)。由图 1 可知,随着 PEG 相对分子质量的增加,萃取率和脂肪酶的分配系数呈现出先增大后减小的趋势;在 PEG 相对分子质量为 4 000时萃取率和分配系数均达到最大,因此选用 PEG 4 000为本实验的萃取剂。

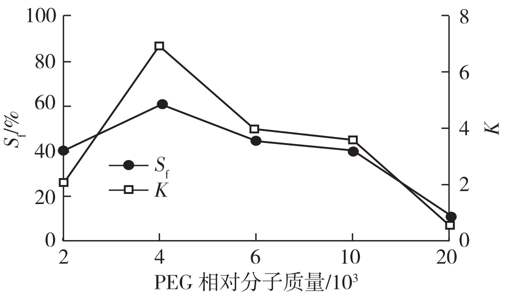

图 1　PEG 相对分子质量对萃取效应的影响

Fig. 1　Effect of PEG molecular weight on aqueous two-phase extraction

2.1.2　盐对萃取效应的影响

本实验选择 PEG/盐体系作为双水相萃取体系。

在酶的分离纯化中,盐的种类对双水相的形成影响很大。在分离脂肪酶的双水相体系中,较常用的盐为 Na_2HPO_4、NaH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$。本实验中由于$(NH_4)_2SO_4$对酶活测定底物的稳定性有影响,因此选择 Na_2HPO_4、NaH_2PO_4作为盐相进行实验。

分别选取 Na_2HPO_4、NaH_2PO_4,质量分数均为 20%,按照 1.4.1 配制双水相体系,分别测定 K、S_f,结果表明选用 NaH_2PO_4时萃取率和分配系数最大,分别为 56.2% 和 6.02。

2.1.3　PEG 用量对萃取效应的影响

固定 NaH_2PO_4质量分数为 20%,以不同质量分数的 PEG4 000 为双水相体系测定萃取率和分配系数(图 2)。由图 2 可知,随 PEG 用量的增加,萃取率和脂肪酶的分配系数均先减小后增大。当体系中 PEG 质量分数大于 30% 时,上相黏度过大,影响萃取操作,导致不能测定体系中的 PEG 质量大于 30% 后的 K 和 S_f。因此选用体系的 PEG 质量分数为 20% 进行下面的实验。

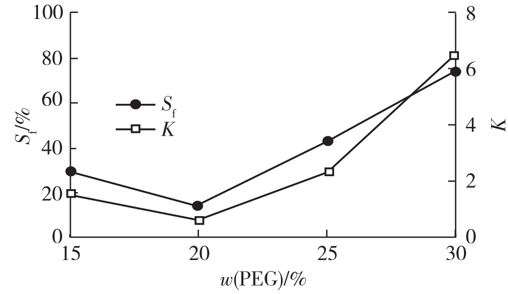

图 2　PEG 质量分数对萃取效应的影响

Fig. 2　Effect of PEG concentration on aqueous two-phase extraction

2.1.4　NaH_2PO_4用量对萃取效应的影响

固定 PEG 质量分数为 20%,以不同 NaH_2PO_4用量为成相体系,分别测定萃取率和分配系数。随着 NaH_2PO_4用量的增加,萃取率和分配系数均呈现出先增加后减小的趋势;当实验体系中的 NaH_2PO_4 质量分数为 20% 时,萃取率和分配系数均达到最大(图 3)。

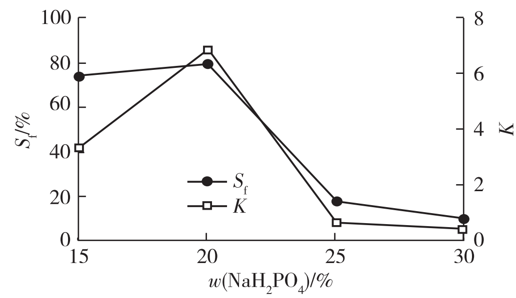

图 3　NaH_2PO_4质量分数对萃取效应的影响

Fig. 3　Effect of NaH_2PO_4 concentration on aqueous two-phase extraction

2.1.5　体系 pH 对萃取效应的影响

体系中 pH 对被萃取物的分配有很大影响,这是由于体系的 pH 变化能明显改变两相的电位差,如体系 pH 与蛋白质的等电点相差越大,蛋白质在两相中分配越不均匀。调节体系的 pH 分别为 6、7、8 和 9,测定萃取率和分配系数。由图 4 可知,随着体系中 pH 增加,萃取率和脂肪酶的分配系数均先增大后减小并在体系 pH 为 7 时达到最大,因此选用 pH 7 为最佳值。

2.1.6　双水相萃取体系的正交优化

由单因素实验可以确定对双水相萃取萃取效率影响较大的因素为 PEG4 000、NaH_2PO_4以及体系

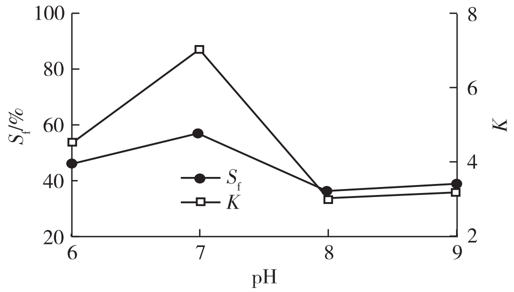

图 4 pH 对萃取效应的影响

Fig. 4 Effect of pH on aqueous two-phase extraction

pH,并初步确定了其影响水平的范围,进一步对已确定的因素水平进行正交实验以确定双水相萃取体系的最优配比。按照表 1 选取的因素和水平,选用 $L_9(3^3)$ 正交表,并按照正交表安排实验,正交实验结果见表 2。由表 2 可知,$A_3B_2C_1$ 为最优水平组合,即双水相萃取体系的 PEG 质量分数为 30%、NaH_2PO_4质量分数为 20%、体系的 pH 为 6。由极差分析比较 $R_A > R_C > R_B$可以看出,各项因素对双水相萃取体系萃取 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的主次顺序是 ACB。即 PEG 用量对萃取效率的影响最大,其次为体系 pH 和 NaH_2PO_4用量。

表 1 正交因素水平表

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A w(PEG)/%	B $w(NaH_2PO_4)$/%	C pH
1	20	17.5	6.0
2	25	20.0	7.0
3	30	22.5	8.0

表 2 正交实验结果

Table 2 Orthogonal design result

实验	因素			分配系数 K	萃取率 S_f/%
	w (PEG)/ %	w (NaH_2PO_4)/ %	pH		
1	20	17.5	6	6.39	73.4
2	20	20.0	7	6.76	77.3
3	20	22.5	8	6.68	74.3
4	25	17.5	8	6.43	77.9
5	25	20.0	6	6.50	78.4
6	25	22.5	7	6.83	76.5
7	30	17.5	7	8.28	83.6
8	30	20.0	8	10.19	84.7
9	30	22.5	6	7.00	80.7

表 3 误差分析

Table 3 Error analysis

误差来源	A	B	C
R	1.903	0.980	1.073
K_1	6.610	7.003	7.803
K_2	6.587	7.817	6.730
K_3	8.490	6.837	7.153

2.2 纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶 SDS-PAGE 电泳

对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶粗酶经硫酸铵沉淀和双水相萃取两步纯化后较粗酶纯化了 22 倍,对纯化后的酶进行 SDS－PAGE 电泳,得到 1 条脂肪酶条带,经过迁移率计算,*Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶的相对分子质量为 3.58×10^4,如图 5 所示。

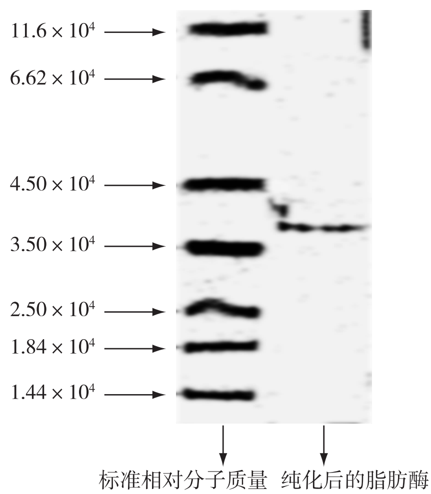

图 5 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶 SDS-PAGE 电泳

Fig. 5 Analysis of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 lipase by SDS-PAGE

本实验相对于其他利用双水相萃取法纯化脂肪酶的报道[5,8－9],具有较好的萃取分离效果。此外,本文的萃取率较报道文献的萃取率稍低可能是由于 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶有两个同工酶,经过双水相萃取后,只纯化得到了其中一个同工酶,另一个同工酶并没有被纯化得到。

2.3 纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的酶学性质

2.3.1 温度对纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的影响

将酶活测定缓冲液分别在不同温度下保温 15

min 后,测定纯化后的脂肪酶活力,结果见图 6。由图 6 可知,*Geotrichum* sp. SYBC WU-3 脂肪酶纯酶在 15 ℃时酶活最高,在 0 ℃时仍保有 15 ℃时酶活的 80%,当温度高于 15 ℃之后迅速失活,至 40 ℃时基本没有活力。

根据 Margesin 等[6] 的定义,*Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶属于低温脂肪酶。

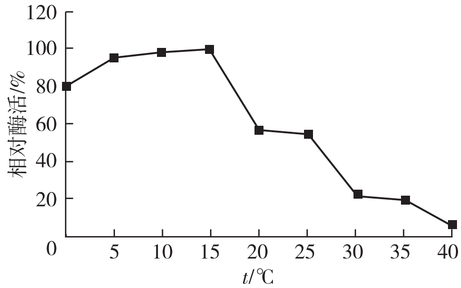

图 6　温度对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶活力的影响

Fig. 6　Effect of temperature on lipase activity of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 lipase

2.3.2　pH 对纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的影响

分别在 pH 为 8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0 的缓冲液中测定纯化后脂肪酶的活力,以确定其最适 pH;酶活测定结果见图 7。由图 7 可知,纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 脂肪酶为碱性脂肪酶,在 50 mmol/L pH 7.0 Tris－HCl 缓冲液中以 *p*－NPB 为底物测定的最适反应 pH 为 9.5,pH 8.0 时的酶活仅为 pH 9.5 时的 40%,pH 10.0 时仍保有 pH 9.5 时 78% 的酶活。

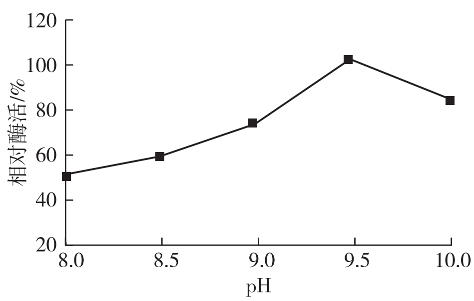

图 7　pH 对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶活力的影响

Fig. 7　Effect of pH on lipase activity of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 lipase

2.3.3　温度对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶纯酶稳定性的影响

纯化后 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶为低温脂肪酶,在低温环境下比较稳定,在 pH 6.0 的 Tris-HCl 缓冲液中放置于 4 ℃冰箱中 20 d,25 ℃ 2 d 也有 80% 左右的酶活。

将纯化后的酶放置于温度为 40 和 50 ℃的水浴锅中保温 1 h,每隔 10 min 取样测定酶活,测定结果如图 8 所示。由图 8 可见,纯化后的酶在 40 ℃环境中也比较稳定,在 50 min 后迅速失活至原酶活的 80% 左右;在 50 ℃的环境中不稳定,10 min 后即失活 47%,10～50 min 基本保持稳定,保持 50 min 后迅速失活至原酶活的 10% 左右。

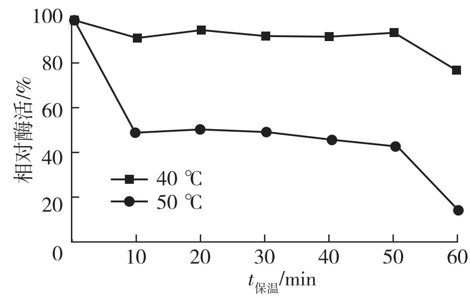

图 8　温度对 *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 脂肪酶纯酶稳定性的影响

Fig. 8　Effect of temperature on lipase activity of *Geotrichum* sp. SYBC WU-3

3　结　论

1)通过双水相体系对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶的萃取分离效果的初步研究,选用了 PEG 4 000/NaH_2PO_4作为成相系统进行了系统的研究,确定双水相萃取体系为:PEG4 000 质量分数为 30%、NaH_2PO_4质量分数为 20%、体系 pH 为 6,在此条件下 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶经硫酸铵沉淀和双水相萃取两步纯化比粗酶纯化了 22 倍;

2)采用硫酸铵沉淀和双水相萃取对 *Geotrichum* sp. SYBC WU－3 脂肪酶粗酶进行分离纯化,得到了电泳纯的脂肪酶,经过迁移率计算,相对分子质量为 3.58×10^4;该酶为低温碱性脂肪酶,最适反应温度为 15 ℃,最适 pH 为 9.5。

参考文献:

[1]　谈重芳,王雁萍,陈林海,等.微生物脂肪酶在工业中的应用及研究进展[J].食品工业科技,2006,27(7):193-195.

Tan Chongfang, Wang Yanping, Chen Linhai, et al. Progress on industry microorganism lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(7): 193-195.

[2] Diamond A D, Hsu J T, et al. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation[J]. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, 1992, 47: 89-135.

[3] Schmid A S, Ventom A M, Asenjo J A, et al. Partitioning and purification of α-amylase in aqueous two-phase systems[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994, 16: 131-142.

[4] 闫云君,陈晖,杨江科,等. ATPS 法分离纯化 *Aspergillus* sp. F044 脂肪酶[J]. 华中科技大学学报, 2005, 33(10): 92-95.
Yan Yunjun, Chen Hui, Yang Jiangke, et al. Separation and purification of *Aspergillus* sp. F044 lipase by aqueous two-phase system [J]. Journal of Huazhong University of Science & Technology, 2005, 33(10): 92-95.

[5] 王俊华,杨洁,付建红,等. 白地霉 *Cryytococcus neoformans* 脂肪酶的双水相萃取[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(6): 71-75.
Wang Junhua, Yang Jie, Fu Jianhong, et al. Lipase extraction of *Cryytocorrus noformans* by aqueous two-phase system[J]. China Biotechnology, 2007, 27(6): 71-75.

[6] Margesin R, Feller G, Hammerle M, et al. A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24: 27-33.

[7] 汪家政. 蛋白质技术手册[K]. 北京:科学技术出版社, 2002.

[8] 周晓云,傅美景. 双水相提取脂肪酶的研究[J]. 浙江农业大学学报, 1997, 23(2): 205-210.
Zhou Xiaoyun, Fu Meijing. Purification of lipase by aqueous two-phase system [J]. Journal of Zhejiang Agricultural University, 1997, 23(2): 205-210.

[9] 付建红,石玉湖,欧阳平凯,等. 产低温脂肪酶菌株 *Geotrichum candidum* ch-3 的选育、发酵条件及酶学性质研究[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(10): 22-27.
Fu Jianhong, Shi Yuhu, Ouyang Pingkai, et al. Cold-adapted lipase produced by *Geotrichum candidum* ch-3: screening, fermentation codition and enzyme characterization[J]. China Biotechnology, 2007, 27(10): 22-27.

国外动态

Primafuel 推出国际藻类生物炼制项目

美国 Primafuel 公司于 2009 年初宣布将开展国际藻类生物炼制项目,通过整合上游的藻类生产和下游的生物精炼系统,开发创新性的商业化藻类利用技术。该公司的专有过程将有效降低成本,实现藻类利用经济潜力的最大化,生产出一系列高价值产品和可再生燃料。

Primafuel 公司总部位于加州,具有商业化藻类生产系统开发的成功经验。该公司与以色列 Ben－Gurion 大学微藻实验室签订了独家技术授权协议,同时,公司在美国和欧洲设有多个生物精炼实验室,其生物精炼研发团队在 2008 年世界经济论坛上获得了生物质转化工艺技术领域的技术先锋奖。过去的几年,该团队致力于生物质分离、纯化和产品转化的研究,研发了多种技术平台,其中 SMAARTTM 油炼制平台已经成功投入商业化运作。

新技术有望降低生物燃料成本

最新出版的《生物燃料、生物制品与生物精炼》(*Biofiiels, Bioproducts & Biorefining*)报道,德国卡尔斯鲁厄技术研究所(Karlsruhe Institute of Technology, KIT)的科学家开发出了一种将植物原料直接转化为液体燃料的新技术,并声称如果正确地建立基础设施,能够将生物燃料成本降低到 0.50 欧元/L。

这种被称为"bioliq"的生物液体燃料技术能够将木材和麦秆等植物原料转化为多种液体燃料和化学品,包括裂解、气化、纯化和催化等步骤,能够得到甲醇、氢气和合成柴油。该研究所正与德国的鲁奇(Lurgi)过程工程公司共同建造基于 bioliq 技术的试验工厂,计划在 2012 年前建成。为了确定合理的生产规模,该研究所的 Nicolaus Dahmen 小组用一个简单的经济模型计算了产能为 100 万 t的 biohq 生产厂的生产成本,最后认为,如果生物质原料先由各原料产地的热解厂(50 家左右)进行预处理、再运送到 1 家燃料生产厂中集中生产生物燃油,就能够大幅节约运输费用。按照这种方式生产出来的生物燃油的成本将会达到 0.56～1.04 欧元/L,略高于传统的汽油和柴油,但二者的差价会在税收优惠之后有所缩小。

(文伟河)