

Tween 80 诱导下米曲霉 3.5232 产胞内脂肪酶的研究

刘洪伟, 许喜林, 李晓凤

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 米曲霉 3.5232 在 Tween 80 诱导下, 相比于葡萄糖作为碳源的培养条件, 米曲霉在细胞壁、细胞膜及细胞质中均可以诱导产生分子质量为 27 kDa 的脂肪酶, 而在细胞质中又有分子质量为 36 kDa 的脂肪酶表达。利用硫酸铵沉淀, DEAE Sephadex Fast Flow 离子色谱交换及 Sephadex G-75 凝胶色谱的分离方法, 从米曲霉细胞质中分离纯化了分子质量为 36 kDa 的脂肪酶。最终纯化倍数为 42.45, 产率为 0.12%。

关键词: 米曲霉 3.5232; 脂肪酶; 诱导; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2012)8-911-914

Purification of Lipases from *Aspergillus oryzae* 3.5232 Induced by Tween 80

LIU Hong-wei, XU Xi-lin, LI Xiao-feng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The expression of the lipase with 27 kDa molecular weight on cell wall, cell membrane and cytoplasm of *Aspergillus oryzae* 3.5232 was induced by Tween 80. Another lipase with 36 kDa molecular weight in cytoplasm was also detected under same conditions. The cytoplasmic lipase was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Sepharose FF and Sephadex G-75 column chromatography. Purification fold was 42.5 and the recovery rate was 0.12%. Molecular weight of purified lipase was 36 kDa.

Key words: *Aspergillus oryzae* 3.5232; lipases; induction; isolation and purification

脂肪酶(三酰基甘油酯水解酶 EC3.1.1.3)是一种能够在油水界面催化三酰基甘油酯水解为甘油和游离脂肪酸的水解酶类。除此之外, 脂肪酶还可以催化其它酯类的水解和转酯反应, 也可以催化酯化反应、酯交换反应、酸水解反应、醇解反应以及氨解反应^[1]。高新生物技术已经将脂肪酶用于合成生物多聚体, 生物柴油以及单一对映异构体高纯度药物, 农药以及风味物质^[2]。脂肪酶能够执行非常具有针对性的化学转换(例如生物改性)使得脂肪酶在食品、清洁剂、化妆品、有机合成和制药工业生产中越来越受到人们的关注^[3]。作为生物催化领域中的先锋催化剂, 脂肪酶的潜在商业价值是巨大的, 可以用于体内以及体外油脂的代谢的脂肪酶在工业生产上有待得到多方面的开发和利用, 而其中与生物技术工业相关潜在的在商业价值为数十亿美元^[4]。

收稿日期: 2012-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(20906031); 教育部高校博士点基金项目(200805611022)

作者简介: 刘洪伟(1987-), 男, 在读硕士, 研究方向: 全细胞催化

通讯作者: 李晓凤(1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事食品与生物化工方面的研究

在大多数关于脂肪酶的参考文献中, 具有较强水解活性的脂肪酶可以由诱导微生物生产, 诱导剂一般是油类或与油类相关物质^[5]。本实验研究了米曲霉在 Tween 80 作为碳源时不同细胞组分脂肪酶的诱导产生情况, 分析并对比研究了其不同细胞组分脂肪酶的水解活力, 并对活力最高的细胞质组分的脂肪酶进行了分离纯化了研究。

1 材料与方 法

1.1 菌种

米曲霉 *Aspergillus oryzae* 3.5232 购自中国科学院微生物研究所, 本课题组保存。

1.2 试剂与设备

DEAE-Sepharose Fast Flow、Sephadex G-75 均购自 Pharmacia 公司; 电泳仪: DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Scientz-IID 超声波破碎仪, 宁波新芝生物科技有限公司; 紫外可见分光光度计: Spectumlab 752s, 上海凌光技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种与培养条件

菌种保藏培养基: PDA 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20

g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水, 1000 mL, 自然 pH。米曲霉 3.5232 在 PDA 培养基上培养 60 h 后制备浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 的孢子悬液;

液体发酵培养基: 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5% 吐温 80/葡萄糖, 0.1% 酵母浸膏(Yeast extract), 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

每 100 mL 米曲霉发酵培养基接种 1.0 mL 孢子悬液。28 °C, 180 r/min 培养 48 h 后, 真空抽滤机抽滤掉液体发酵培养基, 用自来水清洗三次, 20 mM pH 7.5 的 TB 缓冲液清洗两次后获得湿菌体供后续实验用。

1.3.2 米曲霉各组分蛋白质的 SDS-PAGE 分析

从不同培养基中获得的米曲霉菌丝(葡萄糖(浓度为 0.5%)作为碳源两瓶, Tween 80(浓度为 0.5%)3 瓶, Tween 80(浓度为 0.1%)5 瓶), 蒸馏水清洗三次, 缓冲溶液清洗两次后, 加入含 5 mmol/L 巯基乙醇的 pH 7.5 的磷酸缓冲液 35~45 mL 分散菌体。提取细胞壁组分时, 在菌体悬液中加入 1% 的 Triton X-100, 提取细胞膜组分时加入 2.5% 的 Triton X-100 溶液, 分别在 30 °C, 200 r/min 条件下震荡 1 h 与 20 h。经过上述过程的菌体抽滤后获得菌体, 冰上 600 W 下进行细胞超声波破碎 120 次, 12000 ×g 离心后获得的上清液作为细胞内组分(按照改进后的 Shinji Hama 等的方法进行^[5])。利用 100% 的三氯乙酸沉淀细胞膜、细胞壁与细胞质组分蛋白, SDS-PAGE(分离胶 12.5%, 浓缩胶 5%)方法分析三组分的蛋白质组成变化。

1.3.3 酶水解活力的检测

根据 Satyendra Kumar^[6]脂肪酶活力的测定方法测定米曲霉不同培养时间米曲霉菌丝体中脂肪酶活力的分布情况。基本原理为利用比色法可以测定出脂肪酶催化作用下对硝基苯酚棕榈酸酯水解生成对硝基苯酚后溶液的吸光光度值, 再利用标准曲线计算出水解生成的对硝基苯酚的微摩尔量, 进而计算出脂肪酶总活力单位。具体步骤如下。称取 0.076 g, 对硝基棕榈酸酯(4-Npp)利用 10 mL 色谱纯异丙醇溶解(600 W 的超声条件可加速该过程), 配制 20 mM 的对硝基棕榈酸酯溶液。测定样品时, 吸取 75 μL 4-Npp 溶液, 加入待测酶液 10 μL , 3 mL pH 7.5 的 Tris-HCl 缓冲液后在 35 ± 1 °C 下保温发色 10 min。在 -20 °C 条件下保温 8 min 以终止反应。反应体系中加入加相同体积的加热失活(90 °C 以上)的酶液作为对照。水解产生的对硝基苯酚在 410 nm 处比色测定含量。制作 8~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准曲线。样品的酶活力值通过标准曲线计算得到。设置两个平行, 计算平均值。该测试条件下每分钟释放 1 μg 的对硝基苯酚定义为一单位的脂肪酶活力。

1.3.4 米曲霉脂肪酶的提取与纯化

利用 0~30%、30~70%、70~100% 饱和浓度的硫酸铵沉淀米曲霉胞内脂肪酶粗酶液。pH 8.5 0.1 M Tris HCl 缓冲液作为透析液, 透析过夜。将饱和浓度为 0~70% 硫酸铵沉淀获得的组分蛋白 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液透析过夜后上样到 pH 8.5 的 TB 缓冲液平衡 DEAE Sepharose FF 柱(1.6×20 cm)(Pharmacia)色谱柱中。0.1M、0.2 M、0.3 M、0.4 M、0.5 M 梯度洗脱, 流速为 1.2 mL/min。测定各组分的水解活力和 280 nm 波长处吸光光度值。合并各组分后, 旋转蒸发浓缩后, 部分酶液三氯乙酸沉后, SDS-PAGE (12.5%)检测分离出蛋白的分子质量和纯度。

Sephadex G-100 凝胶层析: 上述步骤浓缩后的酶液用上样到 Sephadex G75 凝胶层析(1.6 cm×60 cm)。平衡和洗脱缓冲液均为 50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲溶液。洗脱速度 1.2 mL/min 测定所有组分的脂肪酶活力和 280 nm 处的紫外吸光光度值。合并各有活力组分后, 浓缩后, 部分三氯乙酸沉淀, SDS-PAGE (12.5%)检测分离出蛋白的分子质量和纯度。

2 结果与讨论

2.1 米曲霉 3.5232 在 Tween 80 诱导条件下脂肪酶的表达

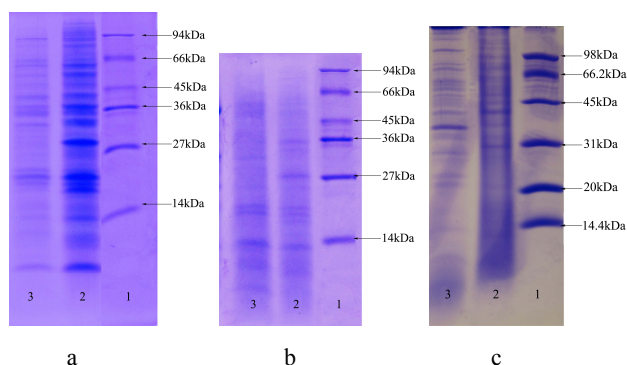


图1 米曲霉 3.5232 在 Tween 80 诱导条件下脂肪酶表达变化的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of the lipases of *Aspergillus oryzae* 3.5232 induced by Tween 80

注: 图 a: 泳道 1 为 marker; 泳道 2, 浓度 0.5% Tween 80 作为碳源, 胞膜粗酶蛋白, 泳道 3 为 0.5% 葡萄糖, 胞膜粗酶蛋白; 图 b: 泳道 1 为 Marker; 泳道 2 为浓度 0.5% Tween 80 作为碳源, 细胞壁蛋白, 泳道 3 为 0.5% 葡萄糖, 细胞壁蛋白; 图 c: 泳道 1 为 Marker, 泳道 2 为 0.5% Tween 80 作为诱导碳源, 胞内粗酶蛋白, 泳道 3 为葡萄糖作为碳源, 浓度为 0.5%, 胞内粗酶蛋白。胶浓度 12.5%。

表 1 米曲霉 3.5232 细胞质、细胞膜、细胞壁及发酵液中脂肪酶水解活力的检测

Table 1 Detection of hydrolytic activity of cell wall, cell membrane, and cytoplasm in *Aspergillus oryzae* 3.5232

组分	胞外(发酵液)		细胞壁		细胞膜		细胞质	
	Tween 80	葡萄糖	Tween 80	葡萄糖	Tween 80	葡萄糖	Tween 80	葡萄糖
酶活力(U/g 或 U/mL)	110.24	56.71	216.39	121.00	147.50	73.29	1058.88	872.14

米曲霉 3.5232 在 Tween 80 诱导条件下脂肪酶表达变化的 SDS-PAGE 图谱如图 1 所示。从图 1 可以发现,米曲霉细胞各组分蛋白质种类表达的顺序为:细胞膜>细胞质>细胞壁~发酵液。在 Tween 80 诱导下,相比于葡萄糖作为碳源,米曲霉细胞壁,细胞膜及细胞质粗酶蛋白电泳图谱中在 27 kDa 处有一条带出现,并且随着 Tween 80 浓度的降低,表达量减少。细胞质中除了在 27 kDa 处有电泳条带表达,在 36 kD 处有另有一条带,证明在 Tween 80 作为碳源时,米曲霉 3.5232 可以在细胞质中诱导产生两种分子质量不同的脂肪酶。Anette McLeod 等^[7]利用蛋白质组学的方法研究了乳酸清酒杆菌(*Lactobacillus sakei*)碳源由葡萄糖替换为核糖时可溶性蛋白种类和表达水平的变化。研究表明,仅仅是碳源的改变,胞内可溶性蛋白中十种蛋白质的表达量增加,六种蛋白质的表达量下降,包括磷酸果糖激酶(Pfk)、醛缩酶(Fba)、丙酮酸激酶(Pyk)。因此,仅仅是碳源变化时,微生物细胞蛋白质的表达种类和数量就会发生很大变化,而脂肪酶可以在油脂或者类似油脂类物质的诱导下表达量突然大量增加,因即便是一维的 SDS-PAGE 也可容易地将其检测出。

在以葡萄糖和 Tween 80 分别作为诱导剂,48 h 米曲霉细胞各组分水解酶活力值如表一所示。可以发现以 Tween 80 作为诱导剂时米曲霉细胞各组分脂肪酶活力均高于葡萄糖作为碳源时的活力,在细胞壁、细胞膜及胞外的脂肪酶活力是其在葡萄糖诱导下活力值的近两倍。

2.2 胞内米曲霉脂肪酶的分离纯化

表 2 米曲霉 3.5232 脂肪酶纯化过程中脂肪酶的数据监控

Table 2 Data inspection during the purification process of the lipase in *Aspergillus oryzae* 3.5232

纯化步骤	总活力/U	总蛋白/mg	产率/%	纯化倍数
粗酶	2379.5	600.1	100	1
硫酸铵沉淀	1612.0	21.4	67.75	19
DEAE Sepharose FF	100.3	0.83	1.48	30.47
Sephadex G-75	20.2	0.12	0.12	42.45

脂肪酶纯化过程中的监控数据如表 2 所示。经过硫酸铵沉淀,DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换色谱和 Sephadex G-75 凝胶色谱分离,从米曲霉细胞质中获得了一株分子质量为 36 kDa 的脂肪酶。产率为

0.12%, 纯化倍数为 42.45。利用 DEAE Sepharose FF 分离时的有脂肪酶水解活力组分蛋白质含量和酶活力组分检测结果如图 2 所示,当利用 0.2 M 的 NaCl 缓冲溶液洗脱时第 9 管组分具有最高紫外吸收值和最大脂肪酶水解活力。利用离子色谱和凝胶色谱分离的脂肪酶纯度电泳检测结果如图 3 所示。

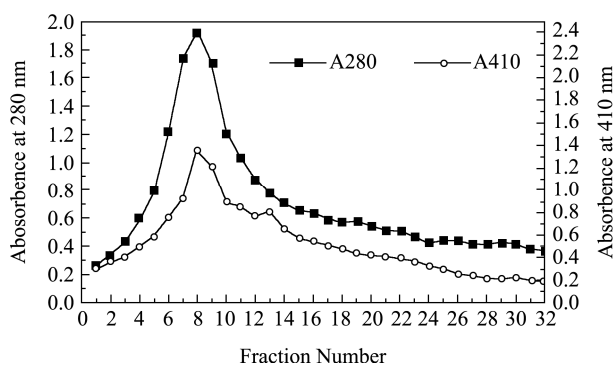


图 2 DEAE-Sepharose FF 分离脂肪酶时分离组分脂肪酶水解活力和蛋白质含量的数据监控图谱

Fig.2 Lipase hydrolytic activity and protein quantity in fractions from DEAE-Sepharose FF

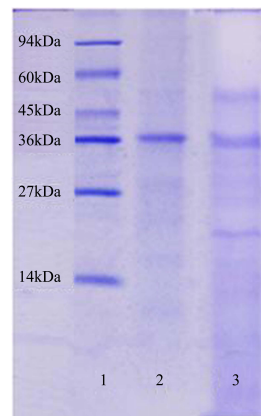


图 3 米曲霉脂肪酶分离过程中 SDS-PAGE 监控结果

Fig.3 SDS-PAGE of proteins lanes

注:泳道 1: 蛋白质 marker; 泳道 2: Sephadex G75 纯化结果; 泳道 3: Sepharose Fast Flow 纯化结果。

Jinichi Toida 等^[8]利用硫酸铵沉淀,丙酮沉淀和例子交换色谱以及凝胶色谱从米曲霉 RIB128 中分离出两株分子质量为 25 和 29 kDa 的脂肪酶。产率为 11%, 相比于最原始的粗酶液纯化了 790 倍。N.C.Mhetras 等^[9]利用硫酸铵沉淀, Phenyl Sepharose (苯基琼脂糖凝胶)和 Sephacryl-100 凝胶色谱从黑曲霉 NCIM1027 中分离出一种胞外脂肪酶。该分离技术获得的脂肪酶

的酶活力纯化倍数为 149, 回收率达到 54%。SDS-PAGE 显示其为单一条带, 相对分子质量为 32.2 kDa, 同时他们还对该脂肪酶的酶学性质进行了研究。华根霉能够在固体和液态深层培养的条件下生产合成脂肪酶。Shu Yang Sun^[10]等利用 Triton X-100 提取了膜链接脂肪酶。利用硫酸铵沉淀, 疏水作用色谱和凝胶色谱的分离方法获得了该脂肪酶的纯品。他们发现固态发酵时与液态发酵时脂肪酶的相对分子质量有着明显的不同, 分别是 62 kDa 和 40 kDa。进一步研究表明这两种不同相对分子质量的脂肪酶最适水解条件以及水解底物和相应的转化率都有所区别。

Yun Teng 等^[11]发现具有水解活力和合成活力的脂肪酶具有不同的发酵特点, 脂肪酶的合成活力主要位于细胞膜上, 这是通过利用 Yatalase 处理华根霉得到的。他们也从胞内纯化出来两株同工脂肪酶, 分子质量分别为 39 kDa 和 59 kDa。这两个脂肪酶都具有很高的水解活力, 但是合成活力几乎没有检测到。华根霉和 *Candida rugosa* 一样可以生产至少五株脂肪酶。本实验利用传统的分离纯化方法从米曲霉 3.5232 细胞质中分离纯化出一株 36 kDa 的脂肪酶, 并未分离到利用 tween 80 作为诱导剂的另外一株分子质量为 27 kDa 的脂肪酶, 这可能由于当以水解活力为分离指标时, 将分子质量为 27 kDa 的脂肪酶排除掉。同时也说明 27 kDa 处的脂肪酶水解活力较低。米曲霉细胞膜上及细胞壁上脂肪酶需要分离纯化后进行进一步研究。

3 结论

3.1 本实验利用 Tween 80 作为诱导剂, 发现两种在葡萄糖作为碳源时不表达或者表达量很少的脂肪酶, 其分子质量分别为 27 kDa 和 36 kDa。其中分子质量 27 kDa 的脂肪酶在细胞壁、细胞膜及细胞质中均能检测出, 而 36 kDa 的脂肪酶只能在细胞质中检测出。利用硫酸铵沉淀, DEAE-sephrose FF 离子交换色谱柱及 Sephadex G75 凝胶色谱柱的分离方法获得了胞内分子质量为 36 kDa 的脂肪酶的电泳纯。最终纯化倍数为 42.45, 产率为 0.12%。

3.2 微生物源脂肪酶是食品、化工及医药工业用脂肪酶的重要来源, 本研究所获取的新型米曲霉胞内脂肪酶进一步丰富了脂肪酶种类, 今后将就其酶学特性及其在食品工业中的应用作进一步研究。

参考文献

[1] Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments [J].

Biotechnol Adv., 2008, 26: 457-470

- [2] Park, H, Lee K, Chi Y, et al. Effects of methanol on the catalytic properties of porcine pancreatic lipase [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 15(2): 296-301
- [3] Gupta N, Shai V, Gupta R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(2): 518-526
- [4] Francisco J. Deive Elisabete Carvalho, Lorenzo Pastrana, et al. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 3630-3637
- [5] Shinji Hama, Sriappareddy Tamalampudi, Takahiro Fukumizu, et al. Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(4): 328-333
- [6] U K Winkler, M Stuckmann. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* [J]. J. Bacteriol., 1979, 138: 663-670
- [7] Anette McLeod, Monique Zagorec, Marie-Christine Champomier-Verges, et al. metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis [J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 120
- [8] Jinichi Toida, Yukihiko Arikawa, Kimio Kondou, et al. Purification and Characterization of Triacylglycerol Lipase from *Aspergillus oryzae* [J]. Bioscience Biotechnology, and Biochemistry, 1998, 62(4): 759-763
- [9] N C Mhetras, K B Bastawde, D V Gokhale. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207 [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1486-1490
- [10] Shu Yang Sun, Yan Xu. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation [J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 1336-1342
- [11] Yun Teng, Yan Xu, Dong Wang. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 57: 292-298