

Thermoanaerobacter sp. X514 嗜热脂肪酶 LipTX 的异源表达与酶学性质研究

魏涛, 杨昆鹏, 郝未未, 毛多斌

(郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002)

摘要: 本文克隆表达了来源于嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 的嗜热脂肪酶 LipTX 基因(Teth514_0029), 利用亲和层析纯化了脂肪酶 LipTX, 并详细研究了该脂肪酶的酶学性质。采用 PCR 技术扩增脂肪酶 LipTX 基因, 克隆到载体 pET15b 中, 构建重组载体 pET15b-LipTX; 将重组载体转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中并利用 IPTG 诱导表达目的蛋白, 经 70 °C 热处理和 Ni-NTA 亲和层析两步纯化, 得到纯化的重组酶。SDS-PAGE 结果表明, 脂肪酶 LipTX 分子量为 28 ku。酶学性质研究表明, 该酶最适反应温度和 pH 分别为 70 °C 和 7.5; 通过水解底物特异性和动力学实验, 发现 LipTX 可以水解不同长链酰基 (C₈-C₁₂) 的对硝基苯酚酯底物, 对硝基苯酚癸酸酯是该酶最适合底物; 同时该酶能够水解链长在 C₄ 到 C₁₆ 范围的三甘油酯底物, 其中以甘油三丁酸酯为底物的酶活力最高。该酶对非极性有机溶剂 (甲醇、乙醇、丙酮、DMF、DMSO 和正己烷和氯仿) 和变性剂 (SDS、Tween-20 和 TritonX-100) 具有较强的抗性, 因此在生物催化和有机化学合成中具有广阔的开发应用前景。

关键词: 嗜热酶; 脂肪酶; 克隆; 表达; 酶学性质

文章编号: 1673-9078(2016)11-91-97

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.014

Heterologous Expression and Enzymatic Properties of Lipase LipTX from Thermophilic Bacterium *Thermoanaerobacter* sp. Strain X514

WEI Tao, YANG Kun-peng, JIA Wei-wei, MAO Duo-bin

(School of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The gene coding for a thermostable lipase LipTX (Teth514_0029) from thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain X514 was cloned and the lipase LipTX was purified using affinity chromatography. The gene coding for lipase LipTX was amplified using polymerase chain reaction (PCR) method, and cloned into a pET15b vector, which was used to construct the recombinant plasmid pET15b-LipTX. The constructed pET15b-LipTX was transformed into host *Escherichia coli* BL21 (DE3) to express the recombinant enzyme via isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. The purified recombinant enzyme was obtained after heat treatment and nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) affinity chromatography. The sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) result showed that the relative molecular mass of lipase LipTX was approximately 28 ku. Study of the enzymatic properties indicated that LipTX displayed optimal activity at 70 °C and pH 7.5. Substrate specificity and kinetics experiments showed that LipTX could hydrolyze *p*-nitrophenyl ester (*p*NP-ester) substrates with different acyl chain lengths (from C₈ to C₁₂), and the most suitable substrate was *p*NP-decanoate. Additionally, this enzyme could hydrolyze triacylglycerols with long acyl chains (from C₄ to C₁₆) and showed the strongest enzymatic activity with tributyrin as the substrate. Furthermore, the recombinant lipase LipTX was found to have strong resistance to non-polar organic solvents (methanol, ethanol, acetone, N,N-dimethylformamide (DMF), dimethyl sulfoxide (DMSO), hexane, and chloroform) and denaturants (sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween-20, and Triton X-100). These results demonstrate that the lipase LipTX has a broad application prospect for biocatalysis and organic synthesis.

Key words: thermophilic enzyme; thermophilic lipase; cloning; expression; enzymatic property

收稿日期: 2015-12-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21406210); 河南省科技创新杰出人才项目 (144200510011)

作者简介: 魏涛 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 香精香料生物合成

通讯作者: 毛多斌 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 烟草化学

脂肪酶 (Lipases, EC3.1.1.3, 又称三酰基甘油水解酶) 属于 α/β 水解酶家族, 能够催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸, 广泛应用于精细化工、食品加工、医药工业、皮革制造、制浆造纸和环境治理等领域^[1-4]。脂肪酶的种类繁多, 在动物、植物和微生物中普遍存在。由于与动植物脂肪酶相比, 微生物脂肪酶作用 pH 及温度范围较广、稳定性及活性高、对底物特异性强, 便于工业化生产获得高纯度酶制剂^[5]。工业酶通常需要在高温或有机相条件下发生催化反应, 中温酶在极端条件下的应用受到限制, 因此开发耐高温和有机溶剂抗性的新型脂肪酶已经成为新的研究热点^[6,7]。一般将来源于极端嗜热古菌和嗜热细菌的耐高温酶称为嗜热酶, 与中温酶相比, 嗜热酶在热稳定、有机溶剂抗逆性和催化速率等方面具有独特的优势, 一经发现就受到学术界的广泛关注^[8,9]。到目前为止, 越来越多的嗜热酶, 如脂肪酶、酯酶、蛋白酶、淀粉酶和木聚糖酶等不断从嗜热菌中被发现与利用^[10,11]。

嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 于 2002 年在美国科罗拉多皮申斯盆地 2000 米地下首次发现, 该菌是一种嗜热极端厌氧微生物, 其最适生长温度为 70 °C^[12]。根据基因组测序和序列分析结果, 嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 基因组中含有多个预测的脂肪酶基因, 这些脂肪酶并没有进行分离纯化及其酶学性质鉴定的研究, 其中包括 Teth514_0029。通过 NCBI Blast 分析, 发现 Teth514_0029 与已报到脂肪酶的氨基酸序列相似性较低 (约 30% 以下), 暗示该酶可能是一种新型脂肪酶。此外, 由于嗜热菌生长条件较为严格, 生长速度缓慢, 要想得到大量的嗜热酶, 仅仅靠培养野生菌远远不够。随着基因工程技术的不断发展, 现在可以将嗜热酶基因克隆和表达, 使其在一些中温宿主中表达, 从而可以在常温下得到大量的嗜热酶。本研究将来自 *Thermoanaerobacter* sp. X514 的脂肪酶基因 Teth514_0029 在大肠杆菌中进行异源表达, 并详细研究其酶学性质, 以为生物化工和食品化工提供新型微生物脂肪酶资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 和大肠杆菌表达质粒 pET15b 为本实验室保存。

1.1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶 (*Nde*I 和 *Sal*I)、高保真 Pyrobest

酶和 T4 DNA 连接酶购自 TAKARA 生物科技公司; 质粒提取试剂盒和 PCR 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京 TIANGEN 公司; Ni-NTA 亲和层析柱, 购自 GE Healthcare 公司; 对硝基苯酚酯和甘油三酯购自美国 sigma 公司; 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

QYC 211 恒温培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; LDZX 型立式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; pH 计, 德国赛多利斯股份公司; DYY-6C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; Y92-III 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; UV-2600 系列紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; BLOO1790 PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; 台式高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; 凝胶成相系统, Syngene 公司; 3730XL DNA 测序仪, 美国 Applied Biosystem 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶 LipTX 序列分析

利用 GenBank 和 MBGD (Microbial Genome Database for Comparative Analysis) 得到 Teth514_0029 的氨基酸序列, 利用 The NCBI BLASTP 和 CLUSTAL W 2.1 软件, 对 *Thermoanaerobacter* sp. X514 脂肪酶 LipTX (Teth514_0029) 及其相关蛋白进行氨基酸序列同源分析。

1.2.2 脂肪酶 LipTX 的基因克隆

根据 GenBank 中脂肪酶 LipTX (Teth514_0029) 的氨基酸序列, 利用 Primer 5.0 软件设计引物如下: 上游引物: 5'-GCCCATATGGTTAAGCTGATAATCAAG-3'; 下游引物: 5'-GATGTCGACTCACCTCTTCAAAAAGGAAAC-3', 加下划线的部分分别表示限制性内切酶 *Nde*I 和 *Sal*I 的酶切位点。所设计引物由上海生工公司合成。以提取嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 基因组 DNA 为模板, PCR 方法扩增脂肪酶 Teth514_0029 基因。扩增条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 预变性 30 s, 52 °C 延伸 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 4 °C 保存。将扩增得到的目的基因片段经 *Nde*I 和 *Sal*I 双酶切后与同样双酶切的 pET15b 质粒连接, 构建重组质粒 pET15b-LipTX 并送上海生工公司测序。

1.2.3 重组蛋白 LipTX 的表达及纯化

将重组质粒 pET15b-LipTX 转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中, 涂布至含 100 mg/L 氨苄青霉素和 34 mg/L 氯霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 12~16 h。挑取阳性转化子单菌落于 5 mL LAC 液体培

培养基中, 培养 12 h; 按 2% 接种量接种至 200 mL LAC 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 2~3 h; 加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L 诱导表达蛋白, 于 37 °C 诱导培养 4 h。离心收集菌体, 加入 20 mL 破壁缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0、20 mmol/L NaCl), 超声波 (功率 400 W, 超声时间 5 s, 间隔 5 s, 超声次数 60 次) 破碎菌体后, 70 °C 热处理 30 min; 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 上清即为 LipTX 粗酶液。采用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析进行 LipTX 的进一步纯化, 并利用 SDS-PAGE 凝胶电泳来检测纯化效果。蛋白质浓度用考马斯亮蓝比色 Bradford 方法测定。

1.2.4 脂肪酶活性的测定

分别采用酸碱滴定法和 p-NPA 法测定脂肪酶的水解活性^[13,14]。1 个酶活力单位定义为: 在 70 °C 和 pH 7.5 条件下, 每分钟水解底物生成 1 μmol 的脂肪酸或对硝基苯酚所需的酶量作为 1 个活力单位(U)。

1.2.5 重组脂肪酶 LipTX 的酶学性质表征

1.2.5.1 动力学参数测定

在 70 °C 和 pH 7.5 条件下, 测定不同对硝基苯酚酯底物浓度 (0.2~20 mmol/L) 时的反应初速度, 用 Lineweaver-Burk 作图法: $1/V-1/[S]$ 作图, 得到动力学曲线, 得到脂肪酶 LipTX 的 K_m 、 k_{cat} 和 k_{cat}/K_m 值。对硝基苯酚酯底物包括: 对硝基苯基乙酸酯 (pNP-acetate)、对硝基苯基丁酸酯 (pNP-butyrate)、对硝基苯基辛酸酯 (pNP-caprylate)、对硝基苯酚癸酸酯 (pNP-decanoate)、对硝基苯基月桂酸酯 (pNP-laurate)、对硝基苯基肉豆蔻酸酯 (pNP-myristate) 和对硝基苯基棕榈酸酯 (pNP-palmitate) 为反应底物。

1.2.5.2 底物特异性

测定底物包括不同碳链长度的甘油三酯和对硝基苯酚酯, 其中甘油三酯包括: 甘油三丁酸酯 (Tributylin)、甘油三己酸酯 (Tricaproin)、甘油三辛酸酯 (Tricaprylin)、甘油三癸酸酯 (Tricaprin)、甘油三月桂酸酯 (Trilaurin)、甘油三肉豆蔻酸酯 (Trimyristin) 和甘油三棕榈酸酯 (Tripalmitin), 配制相同浓度底物 (10 mmol/L), 于标准反应体系中测定酶活, 测得脂肪酶 LipTX 的底物特异性。

1.2.5.3 最适反应温度和 pH

最适反应温度: 通过测定 20~90 °C 范围内, 酶催化水解对硝基苯酚癸酸酯 (10 mmol/L) 底物的活性变化。缓冲体系为 50 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH 7.5), 反应时间为 20 min。热稳定性: 测定相同浓度酶在不同温度 (70、75 和 80 °C) 下保温不同时间的残余酶活力。

以对硝基苯酚癸酸酯为底物, 在不同 pH

(4.0~10.0) 的缓冲液下测酶活性的变化。所用缓冲液为 50 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲液 (pH 3.0~4.0)、醋酸钠缓冲液 (pH 4.5~6.0)、磷酸钠缓冲液 (pH 6.5~8.0)、Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5~9.0) 和 3-环己胺基丙磺酸 (CAPS) 缓冲液 (pH 9.0~10.0)。

1.2.5.4 有机溶剂、金属离子、变性剂及抑制剂对酶活力的影响

在 70 °C 和 pH 7.5 条件下测定体积分数为 20% 或 50% 的不同有机溶剂对酶活性的影响。有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO)、苯酚、甲苯、二甲苯、氯仿和正己烷。酶液与有机溶剂处理 1、24、和 72 h 后, 检测其残余活力。

在 70 °C 和 pH 7.5 条件下测定不同金属离子 (Ni^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Cu^{2+}) 对酶活力的影响。反应体系为 1 mL, 底物对硝基苯酚癸酸酯浓度为 10 mmol/L, 金属离子在体系中的终浓度为 5 mmol/L。

在 70 °C 和 pH 7.5 条件下测定体积比为 1% 和 5% 变性剂 (Tween 20、Tween 80 和 SDS) 以及 5 mmol/L 抑制剂 (EDTA、PMSF 和 DTT) 对酶活性的影响, 反应时间为 30 min。

1.2.6 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据处理, 所有实验重复三次, 结果采用平均值±标准偏差形式表示

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶 LipTX 氨基酸序列分析

NCBI Blast 分析结果表明, 嗜热脂肪酶 LipTX 与 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*、*Caldanaerobacter subterraneus*、*Dehalobacter restrictus* 和 *Clostridium cellulolyticum* 中同源脂肪酶氨基酸序列存在 58~74% 的相似性。利用软件 Clustal W2.1 比对脂肪酶 LipTX 及其同源序列, 结果如图 1 所示, LipTX 具有脂肪酶的保守催化三联体序列, 即 Ser18-Asp211-His214; 此外, LipTX 及其同源序列具有 GDS1/L 保守结构域。

2.2 脂肪酶 LipTX 基因克隆及表达

以 *Thermoanaerobacter* sp. X514 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增达到与预期大小相符的目的基因片段 (726 bp)。经 PCR 方法鉴定阳性克隆后, 对目的基因 LipTX 进行基因测序, 证明嗜热脂肪酶 LipTX 成功克隆到载体 pET15b。重组质粒 pET15b-LipTX 在大肠

杆菌 BL21(DE3)表达后,经超声波破壁、70 °C 热处理和 Ni-NTA 柱亲和层析,得到纯化重组脂肪酶 LipTX,分子量大小为 28 ku,结果如图 2 所示。纯化后脂肪酶

LipTX 酶活比活力达到 2069.23 U/mg, 纯化倍数达到 6.18 倍, 如表 1 所示。

表 1 脂肪酶 LipTX 的纯化过程

Table 1 Purification of the lipase LipTX from *Thermoanaerobacter* sp. strain X514

纯化步骤	总蛋白/mg	总活力/U	比活力(U/mg)	纯化倍数	产率/%
全细胞蛋白	36.92	12364.02	334.89	1	100
热处理后粗蛋白	20.11	9864.12	490.51	1.46	79.78
Ni-NTA 纯化蛋白	3.83	7921.32	2069.23	6.18	64.06

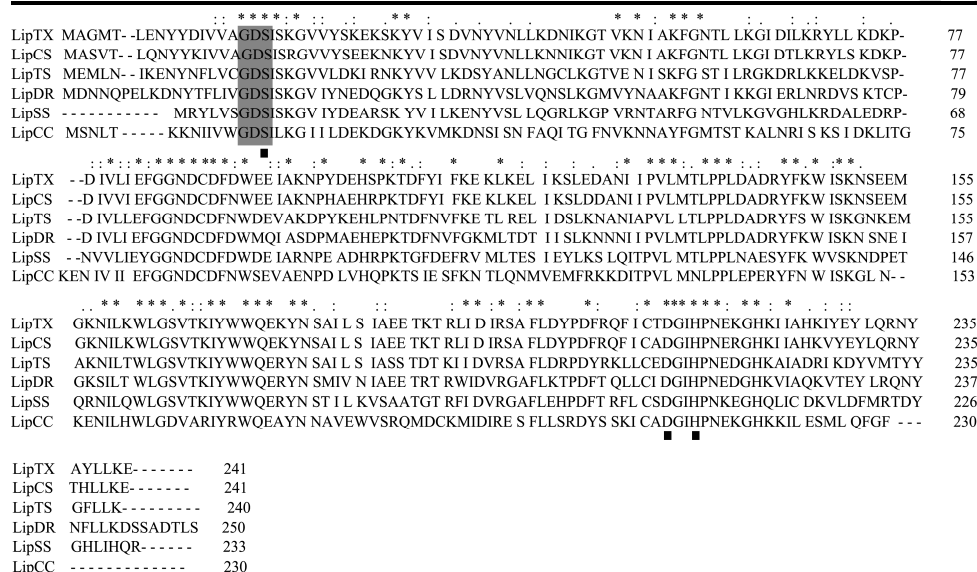


图 1 LipTX 的序列比对及同源性分析

Fig.1 Multiple sequence alignment for LipTX and its homologs

注: 右边序号代表氨基酸的位置; 阴影部分为保守序列; “*”、“.”和“.”分别代表保守的和半保守氨基酸位点; “■”代表催化活性中心; LipTX: *Thermoanaerobacter* sp. X514 (ABY91353); LipCS: *Caldanaerobacter subterraneus* (WP_022588599); LipTS: *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* (WP_045412175); LipDR: *Dehalobacter restrictus* (WP_025206083); LipSS: *Saccharibacillus sacchari* (WP_037292120); LipCC: *Clostridium] cellulolyticum* (WP_015926558)

表 2 脂肪酶 LipTX 水解对硝基苯酚酯底物的动力学参数

Table 2 Kinetic parameters of the purified lipase LipTX for hydrolysis of various pNP-esters

底物 (对硝基苯酚酯)	k_{cat}/s^{-1}	$K_m/\mu M$	$k_{cat}/K_m/(s^{-1}\cdot mM^{-1})$
对硝基苯基乙酸酯(C ₂)	14.62±14.52	168.22±21.64	86.91
对硝基苯基丁酸酯(C ₄)	27.34±5.02	120.11±15.26	227.62
对硝基苯基辛酸酯(C ₈)	41.13±7.62	22.93±4.25	1793.72
对硝基苯酚羧酸酯(C ₁₀)	89.55±4.27	9.82±3.03	9119.14
对硝基苯酚月桂酸酯(C ₁₂)	40.32±4.83	6.82±2.03	5912.02
对硝基苯基肉豆蔻酸酯(C ₁₄)	30.11±1.24	4.42±1.04	6812.21
对硝基苯基棕榈酸酯(C ₁₆)	19.82±2.12	3.51±0.93	5646.72

2.3 脂肪酶 LipTX 酶学性质的研究

2.3.1 脂肪酶 LipTX 的动力学

在 70 °C、50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中测定 LipTX 水解不同对硝基苯酚酯底物的动力学。如表 2 所示, 脂肪酶 LipTX 偏好于中长链 (C₈-C₁₂) 的

底物, 且最适底物为对硝基苯酚羧酸酯 (C₁₀), 其催化催化效率是硝基苯基乙酸酯 (C₂) 底物的 105 倍。当酰基链长小于 10 时, k_{cat} 值或 K_m 值分别随着链长的增加而增加或降低。

在 70 °C、50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.5) 中测定 LipTX 对于甘油三酯的底物特异性。如图 3 所示,

LipTX 能够水解 C4 到 C16 的甘油三酯底物, 其最适底物为甘油三丁酸酯, 随着甘油三酯底物链长的增加, 其催化活力降低。此外, LipTX 催化橄榄油底物的比活力为 23 U/mg, 其能够水解橄榄油底物也证实该酶属于真正意义上的脂肪酶。

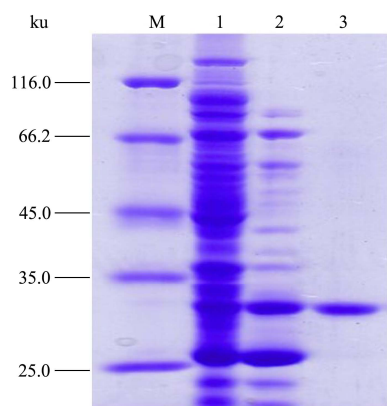


图2 SDS-PAGE 检测重组蛋白在 *E. Coli* BL21 中的表达和纯化
Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of the recombinant lipase in *E. coli* BL21

注: M, 蛋白 Marker; 1, 菌体超声破碎后全蛋白; 2, 热处理后上清粗蛋白; 3, Ni-NTA 柱亲和层析纯化后蛋白。

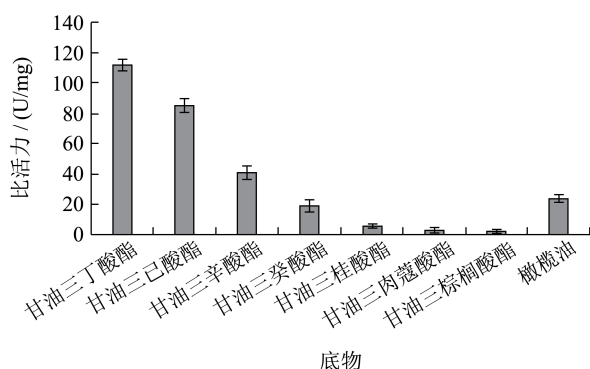


图3 脂肪酶 LipTX 水解甘油三酯底物的特异性
Fig.3 Substrate specificity of LipTX towards different triacylglycerols

2.3.2 脂肪酶 LipTX 最适反应温度与热稳定性

温度对酶活的影响包括两方面内容: 酶的最适温度和热稳定性。在 20~90 °C 温度范围内研究脂肪酶 LipTX 的活力变化情况, 如图 4 所示, LipTX 最适合反应温度为 70 °C, 且在低于最适温度的较宽范围 (50~80 °C) 内具有 50% 以上的活性。目前已报到的嗜热脂肪酶主要存在 *Bacillus* 和 *Pseudomonas* 属中 [15,16], 最适反应温度在 50~60 °C 之间, LipTX 最适反应温度为 70 °C, 使得该酶有可能成为研究酶耐热机制的重要实验材料。

热稳定性实验表明, 在最适反应温度 70 °C 处理 120 min, 具有 90% 以上活性; 80 °C 处理 60 min, 仍

然保持 50% 以上的活性 (如图 5), 说明该酶的热稳定性非常强。

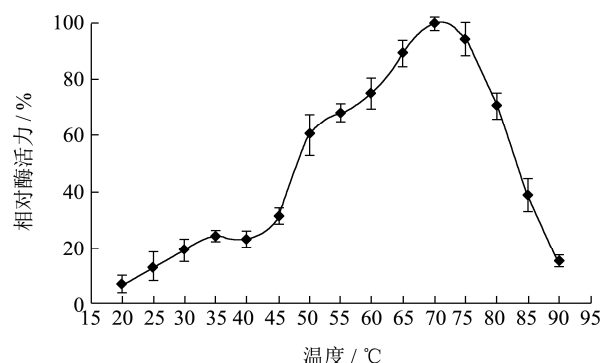


图4 脂肪酶 LipTX 最适反应温度

Fig.4 Optimum temperature of the lipase LipTX

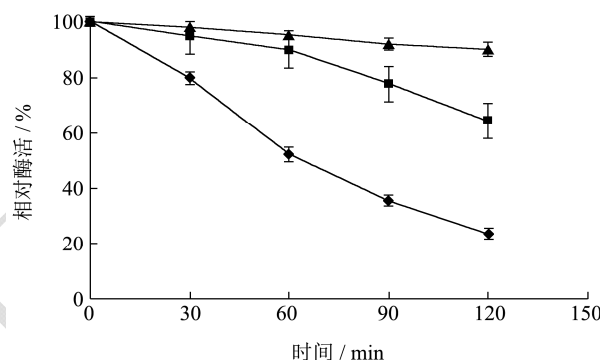


图5 脂肪酶 LipTX 热稳定性

Fig.5 Thermostability of the lipase LipTX

注: 分别在 70 °C (▲)、75 °C (■) 和 80 °C (◆) 条件下测定酶在不同保温时间下的残余活力。

2.3.3 脂肪酶 LipTX 最适反应 pH

在固定反应温度 70 °C, 应用不同范围 pH 缓冲液检测酶活力随 pH 的变化情况。如图 6 所示, 脂肪酶 LipTX 最适 pH 为 7.5, 并在 pH 6.0~8.5 范围内具有 50% 以上的活性, 表明该脂肪酶为弱碱性脂肪酶。

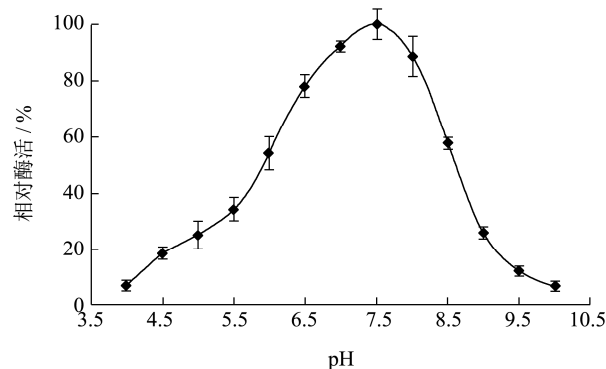


图6 脂肪酶 LipTX 最适反应 pH

Fig.6 Optimum pH of the lipase LipTX

2.3.4 有机溶剂、金属离子、变性剂和抑制剂对脂肪酶 LipTX 酶活力的影响

脂肪酶有机溶剂的抗性在其工业生产具有重要

应用价值。选择常见有机溶剂,研究脂肪酶 LipTX 在其中的活力变化情况。将一定量酶液与 20%或 50%的多种待测有机溶剂在室温保温 1、24 和 72 h,检测其残余活力。如表 3 所示,20%或 50%甲醇、乙醇、丙酮和 DMF 对 LipTX 酶活力有 5.98~48.02%的激活作用;DMSO、正己烷和氯仿对 LipTX 酶活力影响不大;苯酚、甲苯和二甲苯对 LipTX 酶活力具有较大抑制作用。到目前为止报道的抗有机溶剂脂肪酶还较少,Hun 报道了 *Bacillus sphaericus* 205y 脂肪酶活力在正己烷和庚烷中分别提高了 2.9 和 3.5 倍^[13]。LipTX 在多数有机溶剂中比较稳定,这使其在有机合成及相关领域具有很大的应用潜力。

检测不同金属离子(5 mmol/L)对酶活的影响,包括 Ni²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺、Ba²⁺、Ca²⁺、Co²⁺和 Cu²⁺。结果如表 4 所示, Ca²⁺和 Mg²⁺对酶活具有明显激活作用, LipTX 酶活力分别提高了 34.32%和 29.21%; Ni²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺、Co²⁺和 Cu²⁺对酶活具有明显抑制作用,相对酶活分别降至原来的 78.32%、62.39%、52.01%、32.12%和 28.04%。5 mM 的金属螯合剂 EDTA 对酶活也没有明显影响,说明该酶不属于金属依赖型的酶。丝氨酸抑制剂 PMSF 对 LipTX 酶活力的抑制作用(为起始酶活的 21.87%),表明 LipTX 属于丝氨酸水解酶。在 5 mmol/L 还原剂 DTT 作用下,该酶保持 38.04%活性;变性剂 SDS、Tween-20 和 TritonX-100 (1%或 5%, m/V)对脂肪酶 LipTX 活性无影响。

表 3 有机溶剂对嗜热脂肪酶 LipTX 酶力的影响

Table 3 Effect of organic solvents on the activity of LipTX

有机溶剂	浓度 (V/V)%	相对酶活/%		
		1 h	24 h	72 h
对照	0	100	100	100
甲醇	20	148.02±3.10	142.24±4.18	125.42±1.16
	50	129.10±4.49	127.52±3.21	118.02±4.45
乙醇	20	133.54±4.78	130.12±2.54	120.18±5.39
	50	125.21±1.32	115.32±6.84	112.21±2.32
丙酮	20	128.84±1.10	115.35±3.27	108.21±4.38
	50	121.21±3.25	119.38±2.87	115.32±3.57
DMF	20	108.21±1.38	105.98±3.32	98.38±5.45
	50	94.32±3.54	87.32±5.28	81.32±2.21
DMSO	20	98.21±2.39	90.20±3.01	84.31±3.09
	50	95.02±1.12	88.80±4.21	80.21±3.56
氯仿	20	90.30±2.20	81.87±1.54	70.20±3.36
	50	81.30±3.57	72.01±3.36	51.32±4.28
正己烷	20	90.32±2.30	84.84±3.21	74.01±6.08
	50	85.32±3.20	79.45±4.40	69.32±3.87

苯酚	20	93.01±3.08	54.07±5.32	29.09±3.32
	50	90.07±2.30	38.64±2.74	15.70±4.27
甲苯	20	99.91±3.02	65.95±4.65	32.04±5.32
	50	97.01±5.30	57.08±3.12	25.32±5.38
二甲苯	20	98.07±2.30	45.07±2.32	15.08±2.38
	50	95.01±4.20	31.07±4.32	11.01±3.65

表 4 金属离子、变性剂和抑制剂对脂肪酶 LipTX 酶活力影响

Table 4 Effect of metal ions, detergents and inhibitors on the enzyme activity of the lipase LipTX

金属离子或抑制剂	浓度/(mmol/L)	相对酶活/%
对照	0	100
Ca ²⁺	5	134.32±3.39
Mg ²⁺	5	129.21±4.97
Mn ²⁺	5	103.37±2.84
Ba ²⁺	5	62.39±5.64
Ni ²⁺	5	78.35±7.97
Zn ²⁺	5	52.01±2.32
Co ²⁺	5	32.12±3.35
Cu ²⁺	5	28.04±1.39
EDTA	5	105.87±2.35
DTT	5	38.04±3.09
PMSF	5	21.87±4.39
SDS	5	95.47±2.32
Tween-20	5	101.03±3.08
TritonX-100	5	90.87±5.12

3 结论

3.1 本文将来源于嗜热细菌 *Thermoanaerobacter* sp. X514 嗜热脂肪酶 LipTX(Teth514_0029)在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功克隆表达, IPTG 诱导后的目的蛋白经 70 °C 热处理和 Ni-NTA 柱亲和层析,得到纯化重组酶, SDS-PAGE 结果表明该脂肪酶分子量约 28 ku。

3.2 该脂肪酶的最适反应温度和 pH 分别为 70 °C 和 7.5, 并且具有较高的热稳定, 80 °C 处理 60 min 仍然保持 50%以上的活性。

3.3 底物特异性和动力学实验表明该酶偏好水解长链酰基(C₈-C₁₂)的对硝基苯酚酯底物, 最适底物为对硝基苯酚癸酸酯; 该酶能够水解链长在 C₄到 C₁₆范围的三甘油酯底物, 最适底物为甘油三丁酸酯(C₄)。

3.4 金属离子 Ca²⁺和 Mg²⁺对该酶活力分别提高 34.32%和 29.21%, 该酶对有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、DMF、MSO、正己烷和氯仿)和变性剂(SDS、Tween-20 和 TritonX-100)表现出较强的抗性。

3.5 与其他已报到脂肪酶相比, 脂肪酶 LipTX 具有耐热和对有机溶剂抗性强的特性, 在生物催化合成中具

有广阔的开发应用潜力, 同时也有利于微生物脂肪酶研究领域的扩展及其耐热机制的进一步研究。

参考文献

- [1] Levisson M, Vander O J, Kengen S W M. Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(1): 567-581
- [2] Wei T, Feng S X, Mao D B, et al. Characterization of a new thermophilic and acid tolerant esterase from *Thermotoga maritima* capable of hydrolytic resolution of racemic ketoprofen ethyl ester [J]. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 2013, 85(1): 23-30
- [3] 曹茜,冯凤琴.微生物脂肪酶的研究进展及其在食品中的应用[J].中国食品报,2013,13(10):136-141
CAO Xi, FENG Feng-qin. Review of microbial lipases and their applications in food [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(10): 136-141
- [4] 龙彪,饶国华,彭志英,等.食品应用新酶源-极端酶[J].中国食品添加剂,2005,3(3):47-49
LONG Biao, RAO Guo-hua, PENG Zhi-ying, et al. Extremozymes as a source of novel enzymes for application in food industry [J]. *China Food Additives*, 2005, 3(3): 47-50
- [5] 陈贵伦,郑二丽.褶皱假丝酵母脂肪酶催化反应条件的研究[J].现代食品科技,2013,29(4):826-829
CHEN Gui-quan, ZHENG Er-li. Catalytic activity of candida rugosa lipase [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(7): 1496-1500
- [6] Margolin A L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, 15(6): 266-280
- [7] 惠明,张开平,田青,等.Klebsiella sp. B-36 的分离鉴定及产脂肪酶特性研究[J].中国粮油学报,2013,28(10):80-85
HUI Ming, ZHANG Kai-ping, TIAN Qing, et al. Study on isolation and identification of a *Klebsiella* sp.B-36 and properties of lipase [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2013, 28(10): 80-85
- [8] 陈路清,张秀艳,唐彦捷,等.嗜热酶的稳定机制和稳定策略的研究进展[J].科技通报,2008,24(6):792-798
CHEN Lu-qing, ZHANG Xiu-yan, TANG Yan-jie, et al. Process in the molecular mechanism and strategies for thermostability of thermophilic enzyme [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2008, 24(6): 792-798
- [9] 代敏,纪昌涛,汪小锋,等.疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的表面展示及酶学性质[J].微生物学报, 2012,52(7): 857-865
DAI Min, JI Chang-tao, WANG Xiao-feng, et al. Cell surface display of *Thermomyces lanuginosus* lipase in *Pichia pastoris* and its characterization [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 857-865
- [10] Gross R A, Kumar A, Kalra B. Polymer synthesis by *in vitro* enzyme catalysis [J]. *Chem., Rev.*, 2001, 101(11): 2097-2124
- [11] Ameri A, Shakibaie M, Amirpour-Rostami S, et al. Partial purification and characterization of a thermoalkalophilic lipase originated from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and its application for ester synthesis [J]. *Biotechnology*, 2015, 14(4): 154-164
- [12] Roh Y, Liu SV, Li G, et al. Isolation and characterization of metal-reducing *Thermoanaerobacter* strains from deep subsurface environments of the Piceance Basin, Colorado [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6013-6020
- [13] Hun C J, Zaliha R N, Rahman A, et al. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 15(2): 147-151
- [14] Wei T, Xu C P, Yu X, et al. Characterization of a novel thermophilic phospholipase B from *Thermotoga lettingae* TMO: applicability in enzymatic degumming of vegetable oils [J]. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(4): 515-522
- [15] Sharma R, Soni S, Vohra R, et al. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1 [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37(10): 1075-1084
- [16] Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, et al. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, 20(5): 304-307