

生物工程

理性设计提高华根霉脂肪酶对不饱和长链脂肪酸的底物特异性及其在大豆油水解中的应用

江传欢,徐岩,喻晓蔚

(江南大学 生物工程学院,工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:为了提高华根霉脂肪酶在大豆油水解制备脂肪酸中的应用效果,通过理性设计的方法改造脂肪酶的脂肪酸特异性。对突变酶的酶学性质进行了研究,并通过单因素实验优化脂肪酶催化水解大豆油的反应条件。结果表明:利用定点突变技术获得了一系列脂肪酸特异性改变的脂肪酶,其中突变酶 HQL 增强了对不饱和长链脂肪酸的特异性,并且对 *p*-NPP(C16)的水解活力相比野生型提高了 2.72 倍;所有突变酶的最适温度和最适 pH 均为 40 °C 和 8.0,与野生型脂肪酶一致;得到脂肪酶催化水解大豆油的最适反应条件为反应时间 24 h、水油质量比 1:1、加酶量 500 U/g(以油质量计)、pH 8.0、温度 40 °C,在最适反应条件下,野生型酶催化大豆油水解率仅为 80%,而突变酶 HQL 由于增强了对长链不饱和脂肪酸的底物特异性,对大豆油水解率提高到 98%。

关键词:脂肪酶;脂肪酸;理性设计;底物特异性;大豆油水解

中图分类号:Q556;TQ645.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)10-0121-08

Enhancement of substrate specificity towards unsaturated long-chain fatty acids of *Rhizopus chinensis* lipase through rational design for efficient hydrolysis of soybean oil

JIANG Chuanhuan, XU Yan, YU Xiaowei

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: Fatty acid specificity of *Rhizopus chinensis* lipase was altered by rational design for efficient hydrolysis of soybean oil. The enzymatic properties of these variants were studied. The reaction conditions of hydrolysis of soybean oil by the lipase were optimized by single factor experiment. The results showed that a series of variants were obtained by site-directed mutagenesis. Compared with the wild-type lipase, the variant HQL showed enhanced specificity towards unsaturated fatty acids and increased hydrolytic activity for *p*-NPP(C16) by 2.72 fold. The optimal temperature and optimal pH of the variants were 40 °C and 8.0, which were consistent with the wild-type lipase. The optimal reaction conditions of hydrolysis of soybean oil by the lipase were obtained as follows: reaction time 24 h, mass ratio of water to oil 1:1, dosage of lipase 500 U/g (based on oil mass), pH 8.0 and temperature 40 °C. Under the optimal reaction conditions, the hydrolysis rate of soybean oil by the variant HQL increased to 98% due to the increasing specificity towards unsaturated long-chain fatty acids, while it was only 80% for the wild-type lipase.

Key words: lipase; fatty acid; rational design; substrate specificity; hydrolysis of soybean oil

收稿日期:2018-01-17;修回日期:2018-06-29

基金项目:国家自然科学基金(31671799);江苏省“六大人才高峰”人才项目(NY-010)

作者简介:江传欢(1992),女,在读硕士,研究方向为工业脂肪酶的油脂工业应用(E-mail)18322694106@163.com。

通信作者:喻晓蔚,教授,博士(E-mail)bioyuxw@aliyun.com。

脂肪酸是油脂化工中最基础、使用最为广泛的原料之一^[1]。天然油脂水解是获得游离脂肪酸的

重要途径之一。脂肪酸的生产方法主要有皂化法、水解法、蒸汽裂解法以及酶水解法^[2],其中酶水解法由于具有反应条件温和、不饱和脂肪酸不易被氧化、副产物少的优势,成为脂肪酸制取方法的研究热点^[3-4]。不同类型、不同碳链长度及不同比例的脂肪酸具有不同的功能。短链脂肪酸可作为饲料添加剂,促进动物生长^[5]。中链脂肪酸广泛应用于医药、保健食用油及养殖业^[6]。长链饱和脂肪酸如棕榈酸和硬脂酸,主要用于生产作为乳化剂的脂肪酸盐^[7],广泛存在于猪、牛和羊等动物油中,各类饱和脂肪酸质量分数之和通常在60%以上^[8]。长链不饱和脂肪酸在代谢中具有广泛的生理活性,用于健康保健^[9-10]。植物油中不饱和脂肪酸含量较高,如大豆油、菜籽油和油茶籽油中不饱和脂肪酸含量分别为84.34%、77.70%和81.43%^[11-12]。

脂肪酶(Triacylglycerol hydrolase, Lipase, EC 3.1.1.3)是一类甘油三酯水解酶,在油水界面催化酯键的水解或合成,是“绿色”油脂加工制造的重要工业酶^[13-15]。植物油是制备长链脂肪酸最重要的来源,但是多数脂肪酶对不饱和脂肪酸的催化效率低,或倾向于水解中链脂肪酸,因此应用于长链不饱和脂肪酸含量更高的植物油水解时降低了其原料利用率^[16]。例如,Alves等^[17]研究显示,利用单一商品酶(Novozym435、Lipozyme TL-IM和Lipozyme RM-IM)催化水解大豆油的水解率低于50%,复配不同底物特异性的脂肪酶(Lipozyme RM-IM和Novozym435)将水解率提高到80%以上。虽然复合酶的催化效率显著提高,但是目前的研究未能从本质上解决植物油水解率低的难题,如提高酶对不饱和脂肪酸的底物特异性,提高长链脂肪酸特异性等,从而进一步提高植物油水解率。

根霉脂肪酶由于具有高度的位置选择性、立体选择性和高效性,被广泛应用于油脂加工业中。本文以提高酶法水解大豆油的水解率为目标,通过理性设计华根霉(*Rhizopus chinensis*)脂肪酶(RCL)突变位点,以期获得长链不饱和脂肪酸特异性提高的突变酶,考察突变酶的酶学性质与底物特异性;考察脂肪酶催化水解大豆油的最适反应条件;在最适反应条件下,比较野生型与突变酶催化大豆油水解的能力,考察脂肪酶的脂肪酸特异性对大豆油水解率的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒

E. coli JM109,由本实验室提供;重组质粒

pPIC9K-RCL、重组毕赤酵母GS115/pPIC9K-RCL,由本实验室构建;巴斯德毕赤酵母*P. pastoris* GS115,购自Invitrogen公司。

1.1.2 主要试剂

PrimeSTAR HS(Premix)、*Dpn* I、*Big* II、*Sal* I,大连宝生物公司;Biospin纯化试剂盒,杭州博日科技有限公司;氨苄青霉素钠、G418硫酸盐,上海生工生物工程有限公司;福临门一级大豆油,中粮福临门食品营销有限公司;对硝基苯酚酯系列底物:对硝基苯酚乙酸酯(*p*-NPA)、对硝基苯酚丁酸酯(*p*-NPB)、对硝基苯酚戊酸酯(*p*-NPV)、对硝基苯酚辛酸酯(*p*-NPC)、对硝基苯酚月桂酸酯(*p*-NPL)、对硝基苯酚豆蔻酸酯(*p*-NPM)和对硝基苯酚棕榈酸酯(*p*-NPP),Sigma-Aldrich、Alfa Aesar、TCI;色谱纯正己烷,Caledon Laboratories Ltd.;14%三氟化硼甲醇溶液,Sigma-Aldrich;TLC硅胶板(20 cm × 20 cm);脂肪酸甲酯混合标准样品,Sigma-Aldrich。

1.1.3 主要培养基及溶液

LB液体培养基(1 L):10 g胰蛋白胨,5 g酵母提取物,10 g NaCl,121 °C高压灭菌20 min,固体培养基时加入20 g琼脂粉。

YPD液体培养基(1 L):20 g胰蛋白胨,10 g酵母提取物,20 g葡萄糖,115 °C高压灭菌30 min,固体培养基时加入20 g琼脂粉。

MD固体培养基(1 L):13.4 g YNB,4 × 10⁻⁴ g生物素,20 g葡萄糖,20 g琼脂粉,115 °C高压灭菌30 min。

BMGY培养基(1 L):20 g胰蛋白胨,10 g酵母提取物,10 g甘油,100 mmol/L pH 6.0磷酸钾缓冲液,13.4 g YNB,4 × 10⁻⁴ g生物素,115 °C高压灭菌30 min。

BMMY培养基(1 L):20 g胰蛋白胨,10 g酵母提取物,100 mmol/L pH 6.0磷酸钾缓冲液,13.4 g YNB,4 × 10⁻⁴ g生物素,115 °C高压灭菌30 min。

50 × TAE琼脂糖凝胶电泳缓冲液:三羟甲基甲烷(Tris)24.2 g,冰醋酸5.9 mL,0.5 mol/L乙二胺四乙酸(EDTA)10 mL(pH 8.0),双蒸水定容至100 mL。

1.1.4 仪器与设备

PCR仪、离心机,Eppendorf;电泳仪、凝胶成像仪,BIO-RAD;分光光度仪;超声波清洗机;HYL-C组合式摇床,QiangLe;N-EVAP氮吹仪,Organomato;6890N气相色谱仪,Agilent Technologies。

1.2 实验方法

1.2.1 表达华根霉脂肪酶突变体的毕赤酵母重组菌株的构建

根据华根霉脂肪酶晶体结构分析和类似结构脂肪酶晶体结构比较,从增加口袋亲水性、增加位组两个方面选择突变位点,设计引物(见表1),利用全质粒 PCR 技术进行定点突变和组合突变。以重组质粒 pPIC9K - RCL 为模板,利用各个突变位点(除 A116W/I281F 以外)对应的上下游引物进行 PCR 扩增,获得各脂肪酶突变基因片段。将琼脂糖凝胶电泳验证正确的 PCR 产物进行 *Dpn* I 处理,利用 Biospin 纯化试剂盒进行产物纯化。纯化后的产物通过 42 °C 热激转化至 *E. coli* JM109 中,在 LB 固体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素)上 37 °C 生长 10 h 后挑取转化子,接种于 LB 液体培养基(含 100

μg/mL 氨苄青霉素)中 37 °C 培养 10 h,提取质粒。转化子经 *Big* II 酶切验证正确后送至金唯智生物科技有限公司测序,获得序列正确突变的质粒 pPIC9K - RCLL285Q、pPIC9K - RCLT286Q、pPIC9K - RCLHQL、pPIC9K - RCLA116W 和 pPIC9K - RCLI281F。以突变质粒 pPIC9K - RCLA116W 为模板,利用突变位点 I281F 的上下游引物进行 PCR 扩增,按照上述方法获得正确的组合突变质粒 pPIC9K - RCLA116W/I281F。

将突变质粒经 *Sal* I 酶切线性化后电转入毕赤酵母 GS115 中,在 MD 培养基(含 250 μg/mL G418 硫酸盐)上 30 °C 生长 3 d 后挑取转化子,接种于 YPD 液体培养中 30 °C 培养 16 h,提取基因组,利用 pPIC9K 序列引物 5' AOX1 和 3' AOX1 进行 PCR,鉴定阳性转化子,具体方法参考文献[18]。

表 1 突变位点所需的引物及 pPIC9K 序列引物

引物	序列
L285Q FW	TTTCACCTCTATCGCTGATCAGCAAACCTACTTTGGTATTAACG
L285Q RV	CGTTAATACCAAAGTAGGTTTGGTGATCAGCGATAGAGGTGAAA
T286Q FW	CTTTACCTCTATCGCTGATCACTTACAATACTTTGGTATTAACGAAGG
T286Q RV	CCTTCGTTAATACCAAAGTATTGTAAGTGATCAGCGATAGAGGTGAAAAG
HQL FW	TTCACCTCTATCGCTGATCACCAATTAACCTACTTTGGTATTAAC
HQL RV	GTTAATACCAAAGTAGGTTAATTGGTGATCAGCGATAGAGGTGAA
A116W FW	GTGGTACTAATTCCTTCAGAAGCTGGATTACTGACATGGTCTTCAC
A116W RV	GTGAAGACCATGTCAGTAATCCAGCTTCTGAAGGAATTACTACCAC
I281F FW	ACTCTATCGTTCCTTTTCACCTCTTTTGCTGATCACTTAACCTAC
I281F RV	GTAGGTTAAGTGATCAGCAAAAGAGGTGAAAGGAACGATAGAGT
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

注:FW. forward;RV. reverse。

1.2.2 重组毕赤酵母基因工程菌株的发酵培养

将重组菌株划线于 YPD 固体培养基(含 250 μg/mL G418 硫酸盐)上,30 °C 生长 3 d,挑取单菌落接种至含 25 mL BMGY 培养基的 100 mL 锥形瓶中,30 °C、200 r/min 振荡培养 16 h,将含有菌体的 BMGY 培养基 4 °C 6 000 r/min 离心 10 min,收集菌体转接至含 100 mL BMMY 培养基的 500 mL 锥形瓶中,加入 1.5% 甲醇诱导表达蛋白,28 °C 200 r/min 振荡培养,每隔 24 h 补给 1% 甲醇,培养 72 h 后将发酵液 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。

1.2.3 脂肪酶的分离纯化及酶学性质测定

将 1.2.2 收集得到的上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后采用镍柱亲和层析方法纯化得到目的蛋白。

脂肪酶水解活力的测定方法参见文献[19]。酶活的定义为:在一定 pH 和温度条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶

活国际单位。

以不同烷基碳链长度的对硝基苯酚脂肪酸酯(*p*-NPA, C2; *p*-NPB, C4; *p*-NPV, C5; *p*-NPC, C8; *p*-NPL, C12; *p*-NPM, C14; *p*-NPP, C16)为底物,在 pH 8.0 和温度 40 °C 下检测突变酶的脂肪酸链长特异性。

在不同的温度(20 ~ 60 °C)下按标准方法测定酶液的脂肪酶活力,以最高酶活为相对酶活 100%,研究温度对突变酶活力的影响。经过不同温度(20 ~ 60 °C)下保温 1 h 后测定酶液的脂肪酶活力,不保温的酶活力作为对照计算残余酶活力,考察温度对突变酶稳定性的影响。

分别配制 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 6.5 ~ 8)、0.05 mol/L 的 Tris - HCl 缓冲液(pH 8 ~ 9)、0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲(pH 9 ~ 10),将酶液分别加在上述不同 pH 的缓冲液中,在标准条件下测定脂肪酶活力,以最高酶活为相对酶活 100%,研

究 pH 对突变酶活力的影响。酶液在上述不同 pH 的缓冲液中于 25 °C 保温 1 h 后测定酶液的脂肪酶活力,不保温的酶活力作为对照计算残余酶活力,考察 pH 对突变酶稳定性的影响。

1.2.4 华根霉脂肪酶水解大豆油

每份样品称取 5 g 大豆油,将一定量的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液加入 50 mL 三角瓶中,超声使底物充分乳化后,加入适量的脂肪酶,振荡分散均匀,一定温度下水解,反应一定的时间后加入 10 mL 95% 乙醇终止反应,测定水解产物的酸值。酸值测定方法参照 GB/T 5009.37—2003。

1.2.5 大豆油水解率的计算

原料大豆油皂化值的测定参照 GB/T 5534—2008。

$$\text{水解率} = (AV_0 - AV) / (SV - AV) \times 100\%$$

式中: AV_0 为水解后样品的酸值; AV 、 SV 分别为原料大豆油酸值和皂化值。

1.2.6 脂肪酶水解大豆油产生的游离脂肪酸组成分析

脂肪酶在水油质量比为 1:1、加酶量为 500 U/g (以油质量计)、pH 为 8.0、温度为 40 °C 的反应条件下水解大豆油 2 h。用硅胶 G 薄层色谱法分离反应后油脂样品中各组分,两步展开法为苯-乙醚-乙酸乙酯-乙酸(80:10:10:1)和己烷-乙醚-甲酸(80:20:2),在碘蒸气下显色。将分离得到的游离脂肪酸置于 10 mL 具塞比色管中,加入 1 mL 2% H_2SO_4 -甲醇溶液,80 °C 水浴 30 min,取出比色管,冷却至室温,加入 2 mL 正己烷,充分混匀,加入饱和 NaCl 溶液至瓶口,剧烈振荡,静置离心分层,收集上层正己烷相,加入适量的无水硫酸钠,氮吹浓缩进样

分析。

GC 条件:DB-Wax 色谱柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm);进样量 1 μL ;分流比 50:1;进样口温度 225 °C;载气为氮气,流速 30 mL/min;氢气流速 45 mL/min;空气流速 450 mL/min;程序升温,180 °C 保持 1.5 min,以 10 °C/min 升到 210 °C,保持 2 min,然后以 5 °C/min 升到 220 °C 保持 5 min;火焰离子化检测器(FID),温度 250 °C。每个样品检测时间 13.5 min。

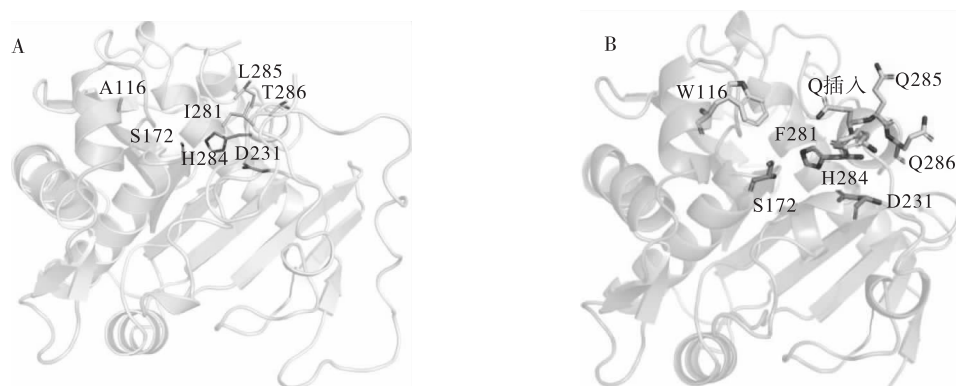
在安捷伦 GC 6890N 气相色谱仪工作站上采用面积归一化法计算大豆油脂肪酸组成及含量。

2 结果与讨论

2.1 华根霉脂肪酶突变位点设计及突变酶的底物特异性

酶底物结合口袋中氨基酸的亲疏水性以及侧链基团大小等因素可能会影响脂肪酶的底物特异性^[20-21]。因此,针对华根霉脂肪酶底物结合口袋设计突变位点,从增加口袋亲水性的角度设计 3 个突变体,包括 L285Q、T286Q 以及在序列 H284 和 L285 中间插入一个亲水氨基酸 Q,突变体命名为 HQL;从增加空间位阻的角度设计 3 个突变位点,包括 A116W、I281F 和 A116W/I281F。脂肪酶 RCL 的三维结构模拟图见图 1。

由图 1A 可知,S172、D231 和 H284 为脂肪酶催化三联体,盖子结构位于脂肪酶活性中心的上方,A116 位于盖子结构上,I281、L285 和 T286 位于底物结合口袋中。由图 1B 可知,W116 和 F281 增加了空间位阻,Q285、Q286 和增加的一个 Q 则增加了口袋亲水性。



注:A. 脂肪酶 RCL 突变前结构;B. 脂肪酶 RCL 突变后结构。所有的突变位点均标记。盖子结构为 T110 ~ T123;催化三联体为 S172、D231 和 H284;突变前位点为 A116、I281、L285 和 T286;突变后位点为 W116、F281、Q285、Q286 和 Q 插入。

图 1 脂肪酶 RCL 的三维结构模拟图

不同突变酶的脂肪酸链长特异性见表 2。由表 2 可知,相较于野生型脂肪酶而言,突变酶 HQL 对

长链脂肪酸的特异性增强,其中对 *p*-NPP(C16) 的特异性最高,水解活力提高至野生型的 2.72 倍。突

变酶 A116W 和 L285Q 均对 *p*-NPP(C16) 的特异性最高,水解活性分别是野生型的 1.27 倍和 1.50 倍。突变酶 I281F 拓宽了水解脂肪酸链长范围,增加了对 *p*-NPA(C2) 的水解活性,对 *p*-NPL(C12) 的特异性最高,水解活性是野生型的 2 倍。另外,突变酶 L285Q、T286Q、HQL、A116W、A116W/I281F 无法水

解 *p*-NPB(C4),并且所有的突变酶对 *p*-NPC(C8) 的水解活性均降低了。通过对华根霉脂肪酶底物结合口袋定点突变获得了一系列脂肪酸特异性改变的突变酶,尤其是获得了对长链脂肪酸特异性增强的突变酶。

表 2 不同突变酶的脂肪酸链长特异性

<i>p</i> NP	脂肪酶比酶活/(U/mg)						
	RCL	L285Q	T286Q	HQL	A116W	I281F	A116W/I281F
C2	0	0	0	0	0	108.33 ± 7.79	0
C4	130.56 ± 18.58	0	0	0	0	171.31 ± 1.04	0
C5	108.50 ± 2.17	167.82 ± 1.04	168.03 ± 3.40	159.11 ± 1.60	127.51 ± 3.07	119.17 ± 0.52	155.08 ± 0.99
C8	230.91 ± 32.05	28.48 ± 0.00	123.02 ± 9.87	103.12 ± 6.79	128.98 ± 11.14	122.33 ± 13.96	80.46 ± 29.68
C12	147.92 ± 4.89	20.31 ± 11.56	113.39 ± 25.53	287.88 ± 19.58	55.98 ± 8.44	308.93 ± 5.19	182.49 ± 4.12
C14	163.09 ± 7.88	63.02 ± 5.59	174.05 ± 2.38	235.33 ± 10.78	128.43 ± 6.53	200.60 ± 5.19	233.21 ± 11.54
C16	171.35 ± 7.06	255.92 ± 1.68	136.02 ± 30.98	466.14 ± 22.37	217.63 ± 2.49	109.25 ± 33.11	144.88 ± 24.32

为了考察脂肪酶对饱和及不饱和长链脂肪酸的底物特异性,以富含该类甘油三酯的大豆油作为底物进行测定。首先测定了大豆油的脂肪酸组成,其含有 13.77% 饱和脂肪酸(棕榈酸 11.19%,硬脂酸 2.58%),以及 86.23% 不饱和脂肪酸(油酸 25.21%,亚油酸 54.67%,亚麻酸 6.34%)。脂肪酶催化水解大豆油的脂肪酸特异性见表 3。

由表 3 可知,突变酶 HQL 增强了对不饱和脂肪酸的特异性,水解不饱和脂肪酸的活力是饱和脂肪

酸的 1.45 倍,而野生型水解不饱和脂肪酸的活力仅是饱和脂肪酸的 1.10 倍。突变酶 HQL 对不饱和脂肪酸特异性更强,因此可以预期 HQL 对大豆油的水解率将会高于野生型酶。另外,突变酶 T286Q、I281F 和 A116W/I281F 增强了对饱和脂肪酸的特异性,水解饱和脂肪酸的活力分别是不饱和脂肪酸的 1.20、1.78 倍和 1.34 倍,这几种脂肪酶突变体将更加适用于饱和脂肪酸含量高的动物油脂。

表 3 脂肪酶催化水解大豆油的脂肪酸特异性

脂肪酸	相对含量/%						
	RCL	L285Q	T286Q	HQL	A116W	I281F	A116W/I281F
棕榈酸	30.10 ± 1.03	36.02 ± 2.57	36.49 ± 0.17	26.35 ± 1.25	34.73 ± 0.76	40.96 ± 0.84	43.28 ± 0.18
硬脂酸	17.30 ± 0.29	14.54 ± 0.89	18.17 ± 0.13	14.40 ± 0.86	13.72 ± 0.06	21.73 ± 2.69	13.92 ± 1.74
油酸	15.89 ± 0.49	19.23 ± 1.48	20.50 ± 0.47	26.18 ± 1.29	20.99 ± 0.32	7.77 ± 3.57	2.74 ± 0.40
亚油酸	16.16 ± 0.33	17.89 ± 0.43	10.99 ± 0.12	21.88 ± 1.08	17.98 ± 0.28	5.10 ± 1.52	6.60 ± 1.28
亚麻酸	20.54 ± 0.09	12.32 ± 2.40	13.85 ± 0.39	11.19 ± 0.25	12.56 ± 0.10	22.44 ± 1.57	33.46 ± 0.77

2.2 温度对脂肪酶活力和稳定性的影响(见图 2)

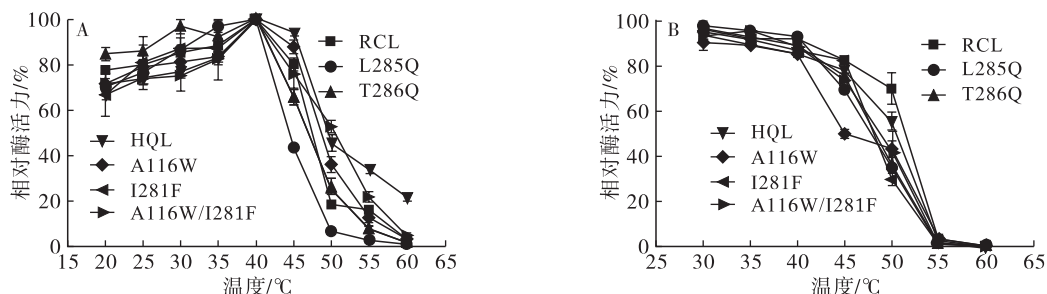


图 2 温度对脂肪酶活力(A)和稳定性(B)的影响

由图 2A 可知,所有突变酶催化反应的最适温度均为 40°C,与野生型的最适温度一致。在 20~40°C 范围内,突变酶 T286Q 的水解活力能够保持在

84% 以上,其他突变酶在 20°C 时均能保留 65% 以上的活力。但是当温度高于 40°C 后,酶蛋白逐渐变性,所有突变酶的活力均显著下降,当温度升至

60℃时,突变酶 HQL 的活力仍保留在 20% 左右,其他突变酶的活力均下降至 10% 以下。由图 2B 可知,在 45℃时,突变酶 HQL 和 I281F 的活力能保持在 80% 左右,只有突变酶 A116W 的活力下降至 50% 左右,而其他突变酶活力则保留在 69% ~ 75% 之间。当温度超过 55℃时,突变酶活力快速下降。实验结果说明温度对突变酶的稳定性有较大的影响。

2.3 pH 对脂肪酶活力和稳定性的影响 (见图 3)

pH 影响酶的构象,也影响与催化有关基团的解离状况及底物分子的解离状态。酶的活力受环境 pH 的影响,在一定 pH 下,酶表现最大活力,高于或低于此 pH,酶活力降低。由图 3A 可知,所有突变

酶催化反应的最适 pH 均为 8.0,与野生型的最适 pH 一致。pH 范围在 7.5 ~ 9.0 之间,只有突变酶 HQL 和 I281F 活力能保持在 50% 以上,其他突变酶在 pH 9.0 时活力均低于 50%。pH 小于 7.5 和 pH 大于 9.0 的情况下,酶活力下降明显,说明反应 pH 显著影响突变酶的活力。由图 3B 可知,所有突变酶均在最适 pH 8.0 下稳定性最好。突变酶 T286Q 相对于野生型稳定性较差,在 pH 7.5 ~ 8.5 之间酶活力才能保持在 60% 以上,而其他突变酶在 pH 7.0 和 pH 9.0 时也能保留 50% 以上的活力。在 pH 小于 7.0 和 pH 大于 9.0 的情况下,稳定性极速减弱,只有突变酶 I281F 在 pH 10.0 时还能保持 22% 的活力。

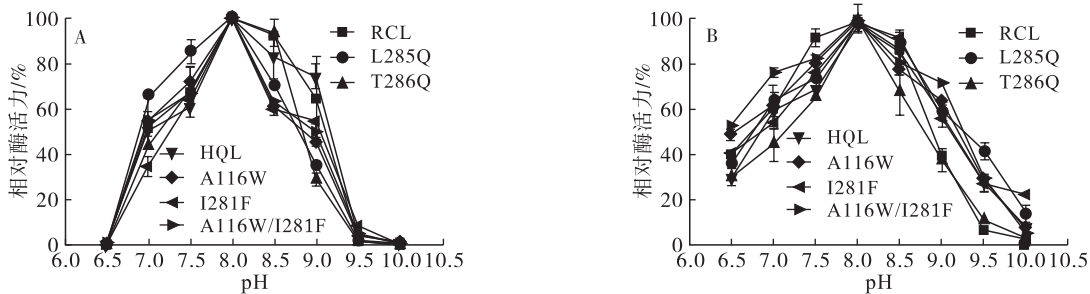
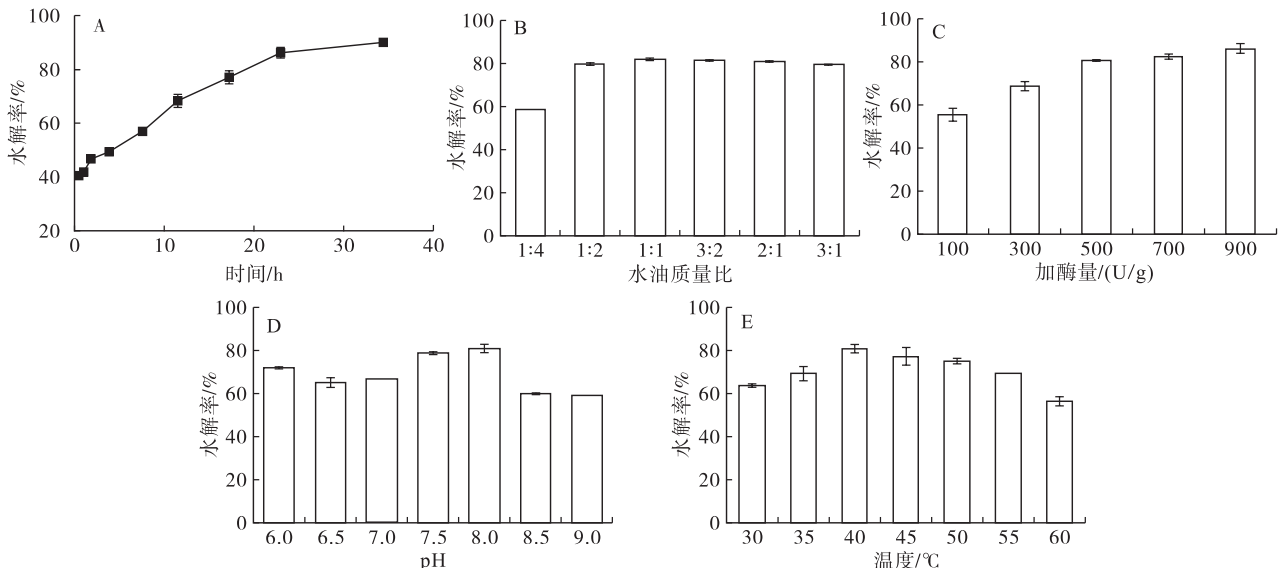


图 3 pH 对脂肪酶活力 (A) 和稳定性 (B) 的影响

2.4 脂肪酶水解大豆油条件优化

由于突变酶的最适温度和最适 pH 与野生型脂肪酶一致,而且温度及 pH 稳定性差异不大,因此选

择野生型脂肪酶为研究对象,研究反应时间、水油质量比、加酶量、pH 和温度对脂肪酶催化水解大豆油反应的影响,结果见图 4。



注:A 反应条件为 pH 8.0、水油质量比 1:1、加酶量 500 U/g (以油质量计)、温度 40℃;B 反应条件为 pH 8.0、加酶量 500 U/g (以油质量计)、温度 40℃、反应时间 24 h;C 反应条件为 pH 8.0、水油质量比 1:1、温度 40℃、反应时间 24 h;D 反应条件为水油质量比 1:1、加酶量 500 U/g (以油质量计)、温度 40℃、反应时间 24 h;E 反应条件为 pH 8.0、水油质量比 1:1、加酶量 500 U/g (以油质量计)、反应时间 24 h。

图 4 反应条件对脂肪酶催化大豆油水解反应的影响

由图 4A 可知,大豆油的水解率前期随着反应时间的延长不断增加,反应到 24 h 时,水解率增大

到80%以上,24 h后水解率趋于平缓,因此以下大豆油反应时间确定为24 h。加水量是决定水解反应化学平衡的重要因素之一。由图4B可知,当水油质量比为1:4~1:2时,水解率从58.6%迅速增加到79.8%,水油质量比在1:2~2:1之间时,水解率增长幅度趋于平缓,水油质量比在1:1时水解率达到最大值82.1%,但是水油质量比在3:1时水解率稍微有些下降,因此确定水油质量比为1:1。由图4C可知,水解率随加酶量的增加而迅速增大,当加酶量超过500 U/g(以油质量计)后,水解率增加缓慢。由图4D可知,pH 8.0时水解率达到最大,为80%,这也是脂肪酶反应的最适pH。由图4E可知,野生型在30~60℃范围内有较高的水解活性,水解率均在55%以上,反应温度为40℃时水解率达到80%。温度升高能够增强底物的乳化效果,使酶与底物充分接触,加快反应速率,促进大豆油的水解;随着温度的升高,脂肪酶的失活速率加快,当温度超过酶的最适温度后,脂肪酶的变性失活速率增大程度大于反应速率增大程度,此时会表现出催化水解率下降的现象。

由以上结果确定脂肪酶催化大豆油水解的最适反应条件:反应时间24 h,水油质量比1:1,加酶量500 U/g(以油质量计),pH 8.0,反应温度40℃。

2.5 不同突变酶催化大豆油水解能力比较

在野生型脂肪酶催化大豆油水解的最适反应条件下,考察突变酶催化大豆油水解的能力,结果见图5。

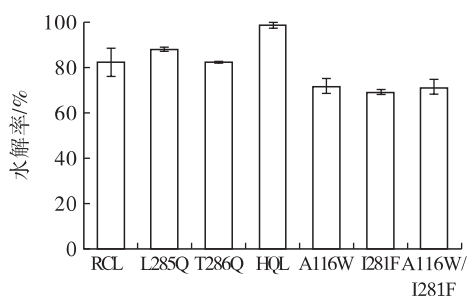


图5 野生型及突变酶催化大豆油水解反应能力的对比

由图5可知,突变酶T286Q与野生型脂肪酶催化大豆油的水解率接近,为82%。突变酶A116W、I281F、A116W/I281F催化大豆油水解的能力弱于野生型,水解率低至70%左右。突变酶L285Q水解能力略高于野生型,水解率达到88%。突变酶HQL催化大豆油水解的能力最高,达到98%左右。由于大豆油中不饱和脂肪酸含量高,占80%以上,而突变酶HQL对长链不饱和脂肪酸特异性相比长链饱和脂肪酸特异性更强,因此催化水解大豆油的能力

显著提高。另外,对饱和脂肪酸特异性高的突变酶可以应用于饱和脂肪酸含量较高的油脂水解,如棕榈油、黄油和椰子油等,也可以选择具有不同脂肪酸特异性的突变酶进行复配,提高脂肪酶在油脂加工行业中的应用价值。

3 结论

本文根据华根霉脂肪酶的结构分析,从增加亲水性和增加空间位阻两个角度设计突变,获得了对不饱和脂肪酸特异性提高,以及对长链脂肪酸催化活性更高的突变体,并对酶学性质进行了研究。在单因素实验条件下,确定了脂肪酶催化大豆油水解的最适反应条件为:反应时间24 h,水油质量比1:1,加酶量500 U/g(以油质量计),pH 8.0,温度40℃。在最适反应条件下,野生型酶催化大豆油水解率仅为80%,而突变酶HQL由于增强了对不饱和脂肪酸的底物特异性,对大豆油水解率提高到98%。本研究通过定点突变理性设计获得了高效水解大豆油的脂肪酶突变体,在油脂加工行业中具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] 于艳艳,郭莹,陈克云. 工业脂肪酸结晶分离方法概况[J]. 科技信息,2010(28):104-105.
- [2] 朱培基. 脂肪酸生产技术发展概况[J]. 粮食与油脂,2000(1):7-8.
- [3] THUM O, OXENBΦLL K M. Biocatalysis: a sustainable method for the production of emollient esters[J]. SÖFW - J,2008, 134(1/2):44-47.
- [4] MOBARAKQAMSARI E, KASRAKERMANS SHAHI R, NOSRATI M, et al. Enzymatic pre-hydrolysis of high fat content dairy wastewater as a pretreatment for anaerobic digestion[J]. Int J Environ Res,2012,6(2):475-480.
- [5] 刘松珍,张雁,张名位,等. 肠道短链脂肪酸产生机制及生理功能的研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(11):99-103.
- [6] 刘梦芸,赵豪斌,邓伶俐,等. 中链脂肪酸在鸡养殖中的应用研究进展[J]. 中国家禽,2016,38(15):43-47.
- [7] HEIDER T P, WOLFGANG S M. Improved stearate composition and method of production thereof;EP1781259 [P]. 2007-05-09.
- [8] 魏永生,郑敏燕,耿薇,等. 常用动、植物食用油中脂肪酸组成的分析[J]. 食品科学,2012,33(16):188-193.
- [9] BRENNAN J T, SALEM N, SINCLAIR A J, et al. α -Linolenic acid supplementation and conversion to *n*-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,2009,80(2):85-91.
- [10] HARWOOD J, CATERSON B. Dietary ω -3 polyun-

- saturated fatty acids and inflammation[J]. *Lipid Technol*, 2006, 18:7-10.
- [11] 丁新杰. 精炼对大豆油和菜籽油中有益微量组分的影响[D]. 郑州:河南工业大学, 2015.
- [12] 李静,王永,杨耀东,等. 棕榈油与常见食用油脂脂肪酸组分的比较分析[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(12): 2124-2128.
- [13] KRISHNA S H, KARANTH N G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media [J]. *Catal Rev*, 2002, 44(4):499-591.
- [14] SANTOS L D, COUTINHO J A, VENTURA S P. From water-in-oil to oil-in-water emulsions to optimize the production of fatty acids using ionic liquids in micellar systems[J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31(6):1473-1480.
- [15] MARTINELLE M, HULT K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B[J]. *BBA-Protein Struct*, 1995, 1251(2):191-197.
- [16] YU X W, XU Y, XIAO R. Lipases from the genus *Rhizopus*: characteristics, expression, protein engineering and application[J]. *Prog Lipid Res*, 2016, 64:57-68.
- [17] ALVES J, VIEIRA N, CUNHA A, et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts [J]. *Rsc Adv*, 2014, 4(14):6863-6868.
- [18] 王乐乐. 华根霉(*Rhizopus chinensis*)脂肪酶的基因克隆、表达、纯化和酶学性质研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2008.
- [19] CHIOU S H, WU W T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(2):197-204.
- [20] JOERGER R D, HAAS M J. Alteration of chain length selectivity of a *Rhizopus delemar* lipase through site-directed mutagenesis[J]. *Lipids*, 1994, 29(6):377-384.
- [21] KLEIN R R, KING G, MOREAU R A, et al. Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling [J]. *Lipids*, 1997, 32(2):123-130.

讣告

山东省粮油科学研究所原所长、高级工程师,第六届山东省人大代表、中国粮油学会原理事、油脂专业分会顾问,温士谦先生,因病医治无效,于2018年9月12日下午5时在济南不幸逝世,享年98岁。

温士谦先生是天津市人,生于1920年9月,1944年6月上海大同大学化工系毕业。参加工作后历任:育发化学制造厂技术员、天津国营事业管理处技士、青岛中国食油公司第二油厂技术员、齐鲁公司青岛植物油厂助理工程师、副工程师、青岛植物油厂副课长、青岛食品工业公司科长、山东省工业厅和轻工业厅工程师、山东省粮食厅工业处工程师、山东省粮油科学研究所工程师、高级工程师、所长。1985年12月加入中国共产党。1990年12月退休。

温士谦先生是我国老一辈油脂与植物蛋白科学研究与实践的开拓者之一。一生著述、成果颇丰,据不完全统计,其先后在《化学世界》《化学工程》《油脂科技》《粮油食品科技》《中国油脂》和《中国粮油学报》等刊物上发表有关油脂与植物蛋白方面的学术论文多达50多篇,出版专著《植物油生产工艺基础知识》,译著《油脂加工工艺学》,是一位著作等身的油脂与植物蛋白方面的科技专家。

温士谦先生20世纪50年代中期参加设计并在青岛建成我国第一套花生预榨-浸出生产线,50年代起改造山东省人力铁榨油厂生产工艺设备等多项。70年代先后设计建成浸出油厂多处,并研制成功JY型米糠浸出器,80年代取得“食用脱脂花生粉及其膨化食品”“花生蛋白炼乳”“棉籽分离蛋白”“浓缩大豆磷脂生产工艺及设备的研究”等获得省部级科技进步奖的成果多项。1992年起享受国务院政府特殊津贴。

温士谦先生四十余年的职业生涯完全贡献给了我国的油脂工业,退休后还一直关注我国油脂科技事业的发展,我们永远缅怀他为中国油脂科技进步做出的突出贡献。

中国粮油学会油脂分会

2018年9月16日