亚临界/超临界 CO_2 处理对 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶活力和结构的影响

陈大伟，刘　云

（华中科技大学生命科学与技术学院，武汉　430074）

摘要：主要研究亚临界/超临界 CO_2 介质中不同处理压力、温度和时间对 *Pseudomonas cepacia* 脂肪酶（*Pseudomonas cepacia* lipase，PCL）活力和结构的影响，以阐述 PCL 在高压条件下的构效关系。首先将 PCL 置于不同的亚临界/超临界 CO_2 中处理一段时间，然后测定其活力和结构的变化。结果表明：在一定压力和温度范围内，PCL 活力随压力和温度的升高而增加，但是处理时间对酶活力的影响较小。SDS-PAGE 分析显示：高压处理不改变 PCL 的一级结构；圆二色和荧光图谱分析却表明：高压对 PCL 二级和三级结构影响较大。亚临界（6 MPa/35℃）处理对 PCL 活力的影响，主要是高压导致蛋白质二级结构 α-螺旋和 β-折叠含量的变化；而超临界（10 MPa/40℃）处理对 PCL 活力的影响，则是由蛋白质三级结构的变化所致，从而阐明亚临界/超临界处理对 PCL 酶活影响的机理。

关键词：生物工程；酶活力；蛋白构象；亚临界/超临界 CO_2；*Pseudomonas cepacia* 脂肪酶

中图分类号：Q814.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2012)09-1649-6

Effect of sub-and super-critical CO_2 pretreatment on activity and structure of *Pseudomonas cepacia* lipase

CHEN Dawei，LIU Yun

(*College of Life Science and Technology*，*Huazhong University of Science and Technology*，*Wuhan*　430074，*China*)

Abstract：The effect of sub-and super-critical CO_2 pretreatment on activity and structure of *Pseudomonas cepacia* lipase（PCL）was studied to explore the relationship between activity and conformation，including pressure，temperature and exposure time. The PCL was exposed in sub-/super-critical CO_2 for a while，and the changes of its activity and conformation were measured. Results showed that the PCL activity increased with the rising of pressure and temperature，but exposure time showed little effect. SDS-PAGE analysis showed that high pressure had no effect on the primary structure of PCL. However，CD and fluorescence analysis showed that high pressure had obvious effect on its secondary structure and tertiary structure. The activity variance of PCL treated in subcritical CO_2（6 MPa/35℃）pretreatment was mainly related to the secondary structure changes in alpha helix and beta folding content，while the activity variance of PCL treated in supercritical CO_2（10 MPa/40℃）pretreatment depended on its tertiary structure changes. The results in this work are helpful to illustrate the mechanism of PCL activity variance in sub-and super-critical CO_2.

Key words：bioengineering；enzyme activity；protein conformation；sub-/super-critical CO_2；*Pseudomonas cepacia* lipase

0　引言

脂肪酶（EC 3.1.1.3）是一类具有特殊酯键水解能力的酶，广泛存在于动植物组织和微生物中，

基金项目：国家自然科学基金（31070709）；高等学校博士学科点专项科研基金（新教师基金）（20090142120090）
作者简介：陈大伟（1987—），男，硕士研究生，主要研究方向：脂肪酶在非水相介质中的构效关系
通信联系人：刘云，副教授，主要研究方向：脂肪酶工程的科研与教学. E-mail：liuyunprivate@sina.com

并广泛应用于食品、制革、饲料、洗涤、油酯化工、生物能源、有机合成和药物手性拆分等领域[1]。PCL 是一类多功能脂肪酶，可催化酯化、转酯、胺化、手性药物拆分等多种反应。研究表明：PCL 是弱碱性酶，具有耐高温、耐短链醇及宽广的 pH 值范围和温度操作稳定性等优点，是目前催化制备生物柴油的理想用酶[2~3]。

高压技术是近年来兴起的食品非热力加工技术，通过钝化食品中的酶，使食品保持原有风味、色泽、营养成分等优点[4]。酶的活力由其特定的空间结构决定，高压条件下蛋白质的活性与空间结构变化呈非线性关系。压力处理对酶活性的作用是有差异的，一般低压处理对酶有激活作用，高压处理可使酶失活。也有研究表明：高压处理技术对脂肪酶有较好的激活作用[5~6]。LOZANO 等[7]的研究表明：固定化南极假丝酵母脂肪酶 B 在高压条件下酶活力提高 84 倍。但是，关于高压处理技术对 PCL 活力和结构的影响尚未见报道。因此，研究高压处理技术中，压力、温度和时间等参数变化对 PCL 活力的影响；同时，利用 SDS-PAGE、圆二色谱（circular dichroism，CD）和荧光光谱等技术，研究高压处理下 PCL 的结构变化，以阐明高压条件下，PCL 活力变化与构象之间的内在机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PCL 购于天野酶制品株式会社（Nagoya，Japan）；正己烷、异辛烷、叔丁醇、异丙醇、乙腈均为国产分析纯化学试剂；液态 CO_2 纯度≥99.9%，购于西安；超临界 CO_2 设备，江苏海安制造；橄榄油购于武汉超市。

1.2 PCL 的高压预处理

将 PCL 溶于 100 mmol/L pH=8.0 的 PBS 中，配成蛋白质浓度为 0.1 g/L 的酶液，然后将酶液置于超临界 CO_2 高压釜中，在不同压力（6，10 MPa）、温度（35，40℃）和时间（20，30，150 min）条件下进行处理，随后测定不同条件下 PCL 的水解酶活和构象。

1.3 PCL 活力测定

脂肪酶水解活力采用橄榄油乳化法[8]，测定脂肪酶对甘油三酯的水解活力。将 5 mL 50 mmol/L 的 PBS 缓冲液、4 mL 橄榄油乳化液［PVA：橄榄油=3：1(体积比)］加入到 50 mL 锥形瓶中，在 40℃水浴中孵育 5 min，随后加入 1 mL 稀释酶液，在 40℃水浴摇床中进行水解反应。反应 10 min 后，加入 15 mL 乙醇-丙酮终止液（体积比为 1：1）终止反应，加入 1～2 滴酚酞，用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴定，记录反应消耗 NaOH 溶液的体积，并做空白对照。脂肪酶水解活力和残余活力用式（1）、式（2）计算可得。

$$水解活力(\mu mol/min)=\frac{(V_{样}-V_{空})\times C\times 1\,000}{T}\times N, \tag{1}$$

$$残余活力(\%)=\frac{处理过的脂肪酶\ PCL\ 水解活力}{未处理的脂肪酶\ PCL\ 水解活力}\times 100, \tag{2}$$

其中，$V_{样}$，$V_{空}$ 分别为样品管和空白管消耗 NaOH 溶液的体积（mL）；C 为 NaOH 溶液物质的量浓度（mol/L）；T 为反应时间（min）；N 为酶液稀释倍数。

1.4 PCL 构象分析

1.4.1 SDS-PAGE 一级结构分析

取处理过的酶液 20 μL 加入 SDS-PAGE 胶孔中，60 V 电泳 30～40 min，然后 120 V 电泳 60 min. 将 SDS-PAGE 胶放入 G-250 中煮沸染色 5 min，然后用脱色液脱色。

分离胶：H_2O 4.9 mL，30% Acrylamide 溶液 6.0 mL，1.5 mol/L Tris-HCl 溶液（pH=8.8）3.8 mL，10% SDS 溶液 0.15 mL，10% $(NH_4)_2S_2O_8$ 溶液 0.15 mL，TEMED 0.006 mL.

浓缩胶：H_2O 4.1 mL，30% Acrylamide 溶液 1.0 mL，1.0 mol/L Tris-HCl 溶液（pH=6.8）

0.75 mL，10% SDS 溶液 0.06 mL，10% $(NH_4)_2S_2O_8$ 溶液 0.06 mL，TEMED 0.006 mL.

1.4.2 圆二色光谱二级结构分析

用圆二色光谱仪 J-810（Jasco 公司，日本）在 20℃检测高压预处理的 PCL 酶液（0.08 g/L）的远紫外光强度，扫描 3 次。其中，扫描波长范围 190～260 nm，数据间隔 1 nm，扫描速度 100 nm/min. 将圆二色数据处理为摩尔椭偏率之差 $\Delta\varepsilon$[(°)·cm^2·dmol^{-1}]，然后将 $\Delta\varepsilon$ 提交到结构分析网站（DICHROWEB）分析蛋白质的二级结构含量[1]。

1.4.3 荧光光谱三级结构分析

用荧光光谱仪 FP-6500（Jasco 公司，日本）在 20℃检测高压预处理的 PCL 酶液（0.1 g/L）的荧光强度，扫描 5 次。其中，激发波长 270 nm，同步扫描波长范围 290～500 nm，数据间隔 0.5 nm，扫描速度 1 000 nm/min.

2 结果与分析

2.1 高压预处理对 PCL 活性的影响

将配好的 PCL 酶液置于压力为 6 MPa 和 10 MPa 条件下处理一段时间后，测定其残余活力，结果如图 1 所示。

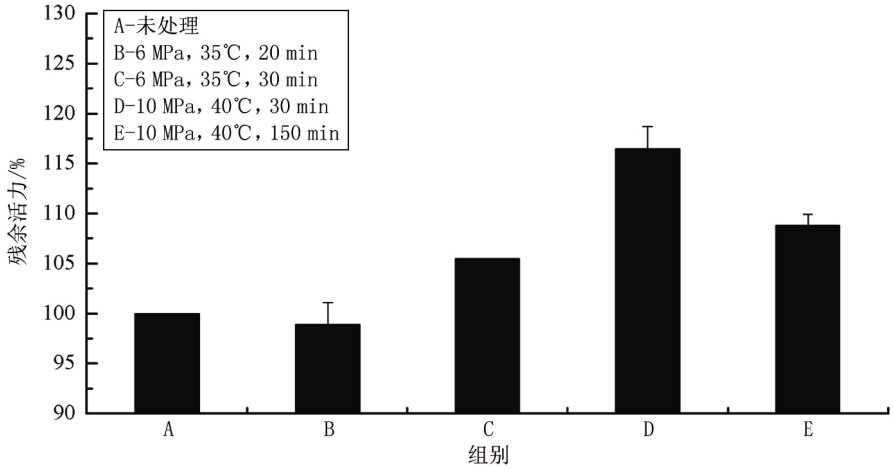

图 1 高压预处理对 PCL 活性的影响

Fig. 1 Effect of high pressure pretreatment on PCL activity

由图 1 可以看出：与未处理的 PCL 相比，不同压力条件下处理 PCL，其活力变化不一样。在 6 MPa/35℃和 10 MPa/40℃处理 30 min，酶活力有所提高，分别提高至 105%和 116%，表明压力和温度的变化对酶活力有显著影响[9]。因此，在一定压力和温度范围内，压力和温度的增加对脂肪酶活力有正向的提高。PEDRO 等[10]研究表明：在 0.1～200 MPa 高压条件下，随着压力的增大，柚苷酶的水解活力先增加后减小，在 160 MPa/30℃取得最大值。EISENMENGER 等[11]研究表明：游离南极假丝酵母脂肪酶 B 在 500 MPa/40℃条件下的酶活力是 0.1 MPa/40℃的 15 倍。PCL 的活力在6 MPa 处理 20 min 时几乎没有变化，处理 30 min 时达到 105%；在 10 MPa 处理 30 min 时达到 116%，处理 150 min 时为 110%. 由此可见，处理时间长短对酶活力的影响甚微[10]。然而，在实验中发现（如图 1 所示）：亚临界条件下（6 MPa/35℃），长时间处理有利于酶活力的提高；而在超临界条件下（10 MPa/40℃），处理时间过长，则会使酶活力下降。分析原因，可能是由于在高压条件下，CO_2 与脂肪酶分子相互作用，使脂肪酶的结构发生变化[9]，这种变化有时为可逆的，随着时间的延长，PCL 的二级结构和高级结构复原，表现为酶活力提高；有时则为不可逆的，表现为酶活力下降。

2.2 高压预处理对 PCL 结构的影响

蛋白质一级结构的变化是指蛋白质分子在外因素作用下的肽键断裂和分子聚集，常用 SDS-PAGE

电泳进行表征。图 2 为高压处理后 PCL 的 SDS-PAGE 电泳图。

由图 2 可以看出：高压处理后，PCL 蛋白分子没有发生肽键断裂和分子聚集，因此，高压对蛋白质分子的一级结构并未产生影响，这一结论与 LAKSHMANAN 等[12]报道的结果一致。ZHANG 等[6]研究了高静水压对蛋白质活力和结构的影响，同样也发现压力对蛋白质的一级结构未产生影响。

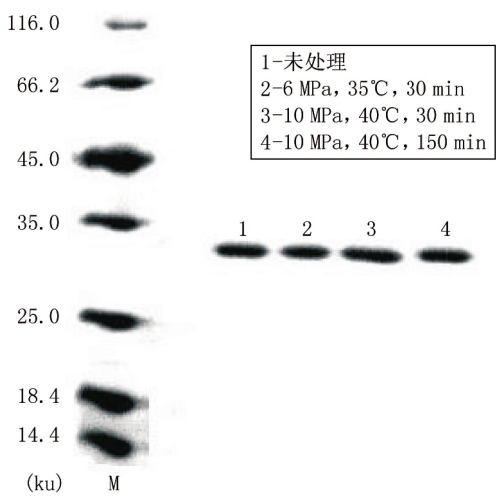

图 2　高压处理 PCL 的 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 2　SDS-PAGE electrophoretogram of PCL pretreated with high pressure

研究表明：远紫外 CD 图谱能较好地反应蛋白质二级结构的变化[2]。高压处理 PCL 二级结构含量和二级结构 CD 图谱分别如表 1 和图 3 所示。

由表 1 可知：不同压力处理下，PCL 的 α-螺旋含量变化明显，这可能是导致 PCL 酶活力变化的主要原因，这一结论与文献[1]和文献[3]报道相同。在 6 MPa/35℃条件下，处理时间对 α-螺旋含量影响显著，而在 10 MPa/40℃条件下，处理时间对 α-螺旋影响很小，因此，可以推测 6 MPa/35℃高压处理对 PCL 活性的影响，主要是由于蛋白质二级结构 α-螺旋和 β-折叠的含量变化所致。LIU 等[13]研究了高压条件下多酚氧化酶活力和结构的变化，结果表明酶活力的增加主要是由于 α-螺旋含量的降低。研究表明：辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）在超临界 CO_2 条件下，酶活力随着压力的增加而降低，主要是由于高压导致蛋白质 α-螺旋含量的降低和荧光强度的增加[14]。

表 1　高压预处理 PCL 的二级结构变化
Table 1　Changes of secondary structure of PCL pretreated with high pressure

处理方式	α-螺旋/%	β-折叠/%	β-转角/%	无规则卷曲/%
未处理	17.8	24.1	24.1	34.0
6 MPa，35℃，20 min	16.2	26.9	21.7	35.2
6 MPa，35℃，30 min	25.0	20.6	23.2	31.2
10 MPa，40℃，30 min	23.9	22.3	22.9	30.9
10 MPa，40℃，150 min	21.5	25.4	23.0	30.1

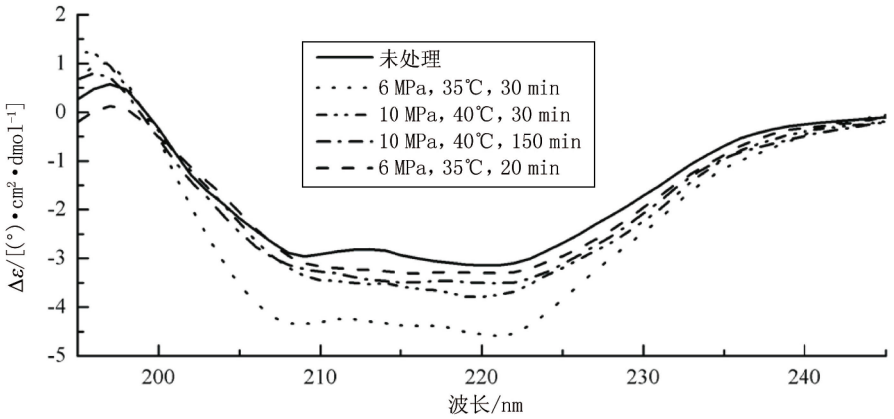

图 3　高压处理脂肪酶 PCL 的圆二色谱图
Fig. 3　CD spectra of PCL pretreated with high pressure

蛋白质三级结构侧链上的芳香族氨基酸——色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸具有内源荧光，因此，蛋白质的荧光光谱图能够反应出蛋白质三级结构的变化[15]。高压预处理 PCL 的荧光光谱图如图 4 所示。

由图 4 可以看出：6 MPa/35℃条件下处理，对 PCL 的三级结构影响甚微，但是 10 MPa/40℃条件

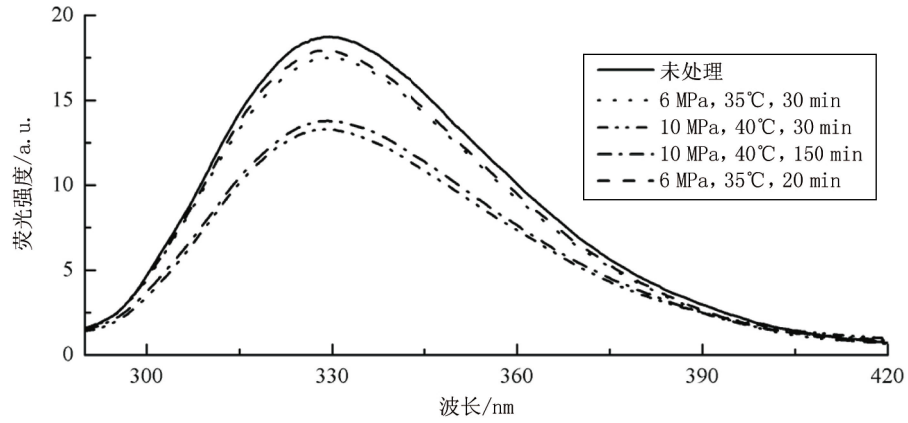

图 4 高压处理 PCL 的荧光光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of PCL pretreated with high pressure

下处理，PCL 三级结构变化很大，此时，色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸等氨基酸包被起来，荧光强度降低。由图 4 还可以看出：6 MPa/35℃和 10 MPa/40℃条件下，处理时间对 PCL 的三级结构几乎没有影响。由此可以推测：高压处理后，PCL 活性的变化可能与其蛋白质三级结构的变化有关。研究表明：植物铁蛋白在经高静水压处理后，酶活力的变化主要是由蛋白质三级结构变化所致，与其一级结构和二级结构无关[6]。

3 结论

初步探讨了亚临界/超临界 CO_2 高压处理对 PCL 活力和结构的影响。结果表明：在一定的压力和温度范围内，压力和温度的增加有助于脂肪酶活力的提高，但是，处理时间对酶活力的影响很小。SDS-PAGE 结果表明：高压处理不影响 PCL 的一级结构。CD 和荧光光谱分析表明：高压处理对 PCL 二级和三级结构影响较大。通过高压条件下 PCL 活力变化与构象之间的关系推测：亚临界（6 MPa/35℃）高压处理下，PCL 活力变化主要是由高压导致蛋白质二级结构 α-螺旋和 β-折叠含量的变化所致；而超临界（10 MPa/40℃）高压处理下，PCL 活性的变化则是由高压导致蛋白质三级结构变化所致。

致谢

高压处理实验在西安交通大学能动学院方涛课题组完成，在此表示感谢！

[参考文献] (References)

[1] LIU Y, CHEN D, YAN Y, et al. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Bulkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(22): 10414-10418.

[2] LIU Y, LIU T, WANG X, et al. Biodiesel synthesis catalyzed by *Burkholderia cenocepacia* lipase supported on macroporous resin NKA in solvent-free and isooctane systems[J]. Energy Fuels, 2011, 25(3): 1206-1212.

[3] LIU Y, ZHANG X, TAN H, et al. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(7): 1176-1180.

[4] SILA D N, SMOUT C, SATARA Y, et al. Combined thermal and high pressure effect on carrot pectinmethylesterase stability and catalytic activity[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(3): 755-764.

[5] KNEZ Z, LAUDANI C G, HABULIN M, et al. Exploiting the pressure effect on lipase-catalyzed wax ester synthesis in dense carbon dioxide[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2007, 97(6): 1366-1375.

[6] ZHANG T, LV C Y, YUN S J, et al. Effect of high hydrostatic pressure (HHP) on structure and activity of phytoferritin[J]. Food Chemistry, 2012, 130(2): 273-278.

[7] LOZANO P, VIIIORA G, GOMEZ D, et al. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide[J]. The Journal of Supercritical Fluid, 2004, 29(1-2): 121-128.

[8] LIU T, LIU Y, WANG X, et al. Improving catalytic performance of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on macroporous resin NKA[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 71(1-2): 45-50.

[9] 曾庆梅，殷允旭，杨毅，等. 超高压处理诸因素对辣根过氧化物酶活力的影响[J]. 食品科学，2007，28 (8)：29-32.
ZENG Q M, YIN Y X, YANG Y, et al. Effects of high pressure (HP) treatment parameters on horseradish peroxidase (HRP) activity[J]. Food Chemistry, 2007, 28(8): 29-32. (in Chinese)

[10] PEDRO H A L, ALFAIA A J, MARQUES J, et al. Design of an immobilized enzyme system for naringin hydrolysis at high-pressure[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(3): 442-446.

[11] EISENMENGER M J, REYES-DE-CORCUERA J I. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 67(1-2): 36-40.

[12] LAKSHMANAN R, PATTERSON M F, PIGGOTT J R. Effects of high-pressure processing on proteolytic enzymes and proteins in cold-smoked salmon during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 541-548.

[13] LIU W, LIU J H, LIU C M, et al. Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(2): 142-147.

[14] GUI F, CHEN F, WU J, et al. Inactivation and structural change of horseradish peroxidase treated with supercritical carbon dioxide[J]. Food Chemistry, 2006, 97(3): 480-489.

[15] ZAMORANO L S, PINA D G, GAVILANES F, et al. Two-state irreversible thermal denaturation of anionic peanut (*Arachis hypogaea* L.) peroxidase[J]. Thermochimica Acta, 2004, 417(1): 67-73.