

海洋微生物低温碱性脂肪酶的 纯化与性质研究*

董宏伟 孙 谧^{†1)} 王跃军[†] 于建生^{††}

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 青岛科技大学化工学院 青岛 266042)

[†](中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)^{††}(青岛科技大学化工学院 青岛 266042)

提要 以海洋微生物通过发酵制备的脂肪酶为材料,对该酶的分离纯化条件及理化性质进行了研究。在脂肪酶纯化中,采用氯仿萃取、中空纤维柱超滤及 CM-Sepharose F F 阳离子交换柱层析等技术对发酵制备的脂肪酶进行了纯化,结果得到达到电泳纯的脂肪酶。在脂肪酶理化性质研究中,采用 SDS-PAGE 电泳对该脂肪酶分子量进行测定,并在实验中以橄榄油为底物采用脂肪酶酸碱滴定测活法,对脂肪酶的最适水解条件、各种因素对脂肪酶稳定性的影响进行了研究。结果显示,该脂肪酶分子量为 (38.0 ± 1) kD,最适水解温度为 35°C ,最适 pH 为 8.5,为一低温碱性脂肪酶。该脂肪酶可在 35°C 以下、 $\text{pH} = 4.0\text{—}9.0$ 范围内保持良好的稳定性,与常见金属离子、化学试剂等的配伍性较好,并且具有良好的耐盐及抗氧化性能。研究中还以 *p*-NPL(月桂酸对硝基苯酚酯)为底物采用脂肪酶化学发光测活法,对脂肪酶进行了酶促动力学的研究。结果表明,该脂肪酶在最适条件下 K_m 值为 $7.805\mu\text{mol/L}$, V_{\max} 为 $1.2385\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。通过对 Zn^{2+} 抑制脂肪酶水解活性的研究,发现 Zn^{2+} 对脂肪酶具有可逆抑制作用,从而筛选到该脂肪酶的可逆抑制剂 Zn^{2+} 。

关键词 海洋微生物,低温碱性脂肪酶,分离纯化,理化性质

中图分类号 Q936

近年来,随着生物技术的发展,寻找具有全新性质的酶已成为国际酶制剂研究的热点(Chandrasekaran, 1997; Pooja *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1996; Alquati *et al.*, 2002)。生长在海洋这一独特环境中的海洋生物,特别是生活在极端环境下的海洋微生物和微藻,能产生丰富的极端酶。与陆地微生物所产生的酶相比,海洋酶具有更为独特的酶学性质,引起了国内外研究人员的极大关注。脂肪酶(甘油酯水解酶, E. C. 3.1.1.3)是一类特殊的酯键水解酶,它能催化天然底物油脂(甘油三酯)水解,产生脂肪酸和甘油。因此,脂肪酶在日用化工、海洋食品加工、化学工业以及利用海洋动物脂肪制备不饱和脂肪酸等领

域具有广阔的应用前景(郑毅等, 1999)。其中微生物产生的脂肪酶由于种类繁多,具有更广的 pH 值和温度的适应范围,以及对底物的专一性,又便于工业生产、获取高纯度制剂及在酶理论研究和实际应用中的独特地位,而得到广泛的研究并成为最具发展前途的酶(张树政, 1984)。

自 20 世纪 90 年代初起,国际上相继开发出中温脂肪酶、高温碱性脂肪酶、中温碱性脂肪酶等,但脂肪酶酶学性质的研究仍无法满足现代化学工业的需求。因此从海洋筛选出具有独特酶学性质的脂肪酶,确实是微生物脂肪酶开发的一大进步,必将会对酶制剂工业带来新的生机和活力。国外已经开始对产脂肪酶海洋微生物进行了筛选

* 国家“863”计划资助项目,2001AA625070 号。董宏伟,硕士, E-mail: arokas_dhw@sohu.com

1) 通讯作者: 孙 谧,研究员,博士生导师, E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2003-09-25; 收修改稿日期: 2004-02-27

(Chandrasekaran, 1997; Saovaneet *et al.*, 1999; Zacccone *et al.*, 2002), 但有关海洋微生物脂肪酶制备和性质方面的详细研究和海洋低温碱性脂肪酶的研究尚未见报道。我国海洋微生物脂肪酶研究起步较晚, 仅有杨从发等(2000)从海水、海泥、海洋生物的消化道分离到碱性脂肪酶产生菌的报道。由于海洋微生物存在海水培养和脂肪酶分离纯化困难等问题, 限制了海洋脂肪酶在制备与应用方面的研究。

邵铁娟等(2004)¹⁾对从渤海底泥中筛选到的一株产脂肪酶微生物进行了菌种鉴定及产脂肪酶发酵条件的研究。作者对该新型海洋微生物低温碱性脂肪酶进行了纯化, 建立了分离纯化方法并对该脂肪酶的理化性质进行了研究, 以期为进一步研究脂肪酶的酶学特性、结构与功能关系创造条件, 同时也为海洋脂肪酶的工业化生产和推广应用奠定良好的基础。

1 试剂和仪器

聚乙烯醇(PVA, 聚合度为 1750 ± 50 , 天津市化学试剂三厂); 橄榄油[中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 蛋白电泳 Marker(上海丽珠东风生物技术有限公司); 其它化学试剂均为国产分析纯。SDS-PAGE 垂直凝胶电泳仪(美国伯乐公司), 中空纤维柱(瑞典 Amersham Bioscience 公司), Alliance2690-PAD2996 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司)。

2 实验方法

2.1 脂肪酶活性的测定

采用中华人民共和国行业标准(中华人民共和国轻工业部, 1993)。脂肪酶水解活力单位: 以脂肪酶水解油脂, 每分钟产生 $1 \mu\text{mol}$ 脂肪酸的酶量, 定义为一个脂肪酶活力单位(U)。

2.2 蛋白质浓度的测定

采用 Lowry 法进行测定(Lowry *et al.*, 1951)。

2.3 SDS-PAGE

按 Laemmli 法进行(Laemmli, 1970)。

2.4 氯仿萃取脱脂

收集发酵上清液, 加入氯仿(氯仿与发酵液的体积比为 5:100), 充分搅拌, 于 4°C 静置 30min。4000r/min 离心 40min 破乳、去除杂蛋白并收集上清液。

2.5 超滤浓缩

经截留分子量为 100kD 的中空纤维柱超滤, 再以截留分子量为 10kD 的中空纤维柱浓缩。

2.6 阳离子交换柱层析

以 CM Sepharose F F 阳离子交换层析柱对脂肪酶柱层析。分步收集洗脱液, 并测定脂肪酶比活。

2.7 脂肪酶 K_m 和 V_{max} 的测定

以月桂酸对硝基苯酚酯为底物, 进行脂肪酶活力的测定(高贵等, 2002); 以 Lineweaver-Burk 法进行脂肪酶 K_m 和 V_{max} 的测定(Sharma *et al.*, 2002)。

3 结果与讨论

3.1 海洋微生物脂肪酶的分离纯化

3.1.1 氯仿萃取脱脂 为了消除发酵残余橄榄油对脂肪酶纯化影响, 以氯仿为萃取剂对橄榄油萃取。氯仿加入量对脂肪酶活力的影响见图 1。

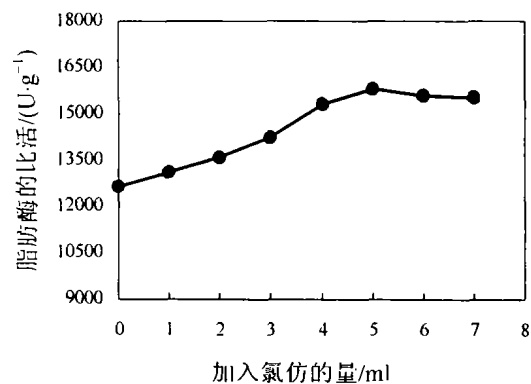


图 1 萃取剂对发酵液脂肪酶活力的影响

Fig.1 Effect on lipase activity of the supernatant by extractant

如图 1 所示, 当氯仿加入量为 5ml (氯仿与发酵液体积比为 5:100) 时, 脂肪酶比活最高, 达 15828U/g, 纯度比初始提高了 1.2 倍。

3.1.2 超滤浓缩 选取截留分子量为 100kD 和 10kD 的中空纤维柱对脂肪酶进行初步纯化(陈建平等, 1998; Kamini *et al.*, 2000)。SDS-PAGE 电泳及表 1 数据表明, 脂肪酶发酵液经超滤, 去除部分杂蛋白, 脂肪酶比活为 41288U/g, 比氯仿处理后的脂肪酶纯度提高 3.3 倍。

1) 邵铁娟, 孙 谧, 于建生等, 2004. 适冷性海洋酵母的鉴定及其产脂肪酶条件的研究

3.1.3 阳离子交换柱层析 以 CM Sepharose F F 阳离子交换层析柱对超滤浓缩脂肪酶柱层析, 经条件筛选的结果见图 2。测定分步收集液脂肪酶活性, 24min 开始检测到脂肪酶活性; 32min 脂肪酶活性达到最大值, 此时紫外检测器检测到最

大吸光值。因此图 1 中第三个峰为脂肪酶洗脱峰。合并 30—34min 收集组分并测定脂肪酶活力及蛋白质含量。表 1 显示, 经柱层析脂肪酶比活为 206224U/g, 纯度在超滤的基础上提高了 5.0 倍。

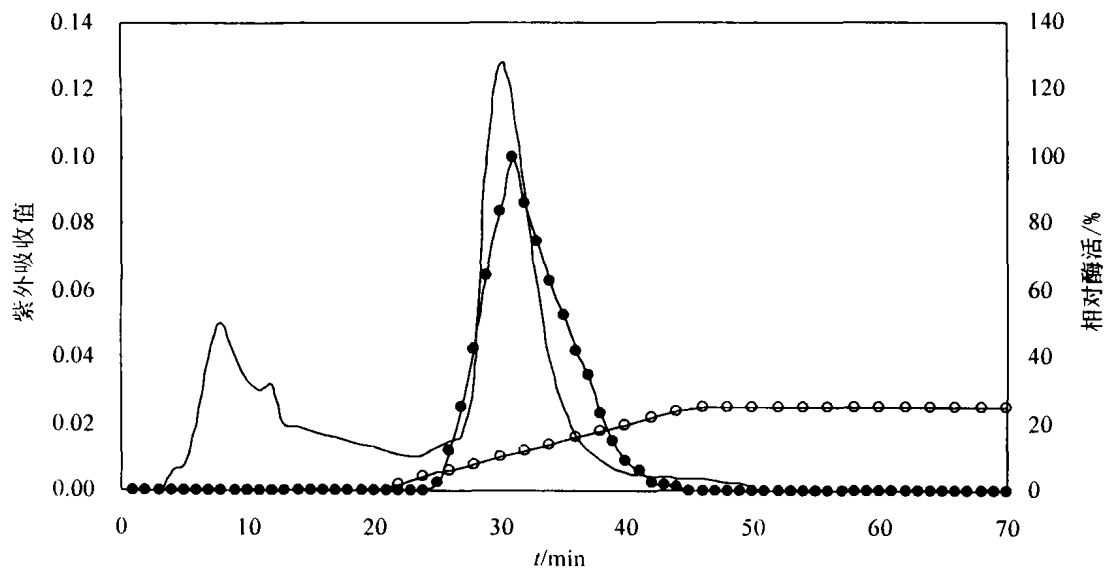


图 2 脂肪酶的 CM Sepharose FF 阳离子交换树脂纯化图谱

Fig.2 The lipase were chromatographed on CM Sepharose FF

—280nm 紫外吸收曲线;—●—相对酶活曲线;—○— NaCl 浓度变化曲线

流速: 1ml/min; 检测波长: 280nm; 上样缓冲液: pH 3.8, 10mmol/L 柠檬酸 - 1mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液;

洗脱液: pH 3.8, 10mmol/L 柠檬酸 - 1mmol/L 磷酸氢二钠缓冲液 + 1mol/L NaCl

表 1 脂肪酶纯化结果

Tab.1 Purification of lipase from culture supernatant

项 目	酶活 (U/ml)	蛋白质含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	活性回收率 (%)	蛋白回收率 (%)	比活 (U/g)	纯化倍数
发酵上清液	91.3	7216.15	100.0	100.0	12652	1.0
氯仿处理液	75.3	4757.11	82.5	65.9	15828	1.2
10 万超滤滤过液	81.7	3356.31	71.6	37.2	24342	1.9
1 万超滤浓缩液	307.2	7440.42	67.3	20.6	41288	3.3
CM sepharose 柱层析	33.4	161.96	27.6	1.69	206224	16.3

3.1.4 脂肪酶纯度及相对分子质量测定 将经 CM Sepharose 纯化的脂肪酶以 SDS-PAGE 分析, 结果为单一蛋白条带。纯化后的脂肪酶分子量由 SDS-PAGE 测定为 $(38 \pm 1)\text{kD}$, 结果见图 3。

3.2 海洋微生物脂肪酶的理化性质研究

3.2.1 温度、pH 对脂肪酶活力的影响 选用

pH = 4—9.5 的磷酸盐缓冲液, 分别在 5—50℃ 下进行脂肪酶水解活力的测定。测定结果通过分析软件对实验数据进行分析处理作三维图, 结果见图 4。

由图 4 可知, 该脂肪酶最适水解条件为: pH 8.5、温度 35℃。当 pH = 8.5、温度大于 35℃ 时, 等

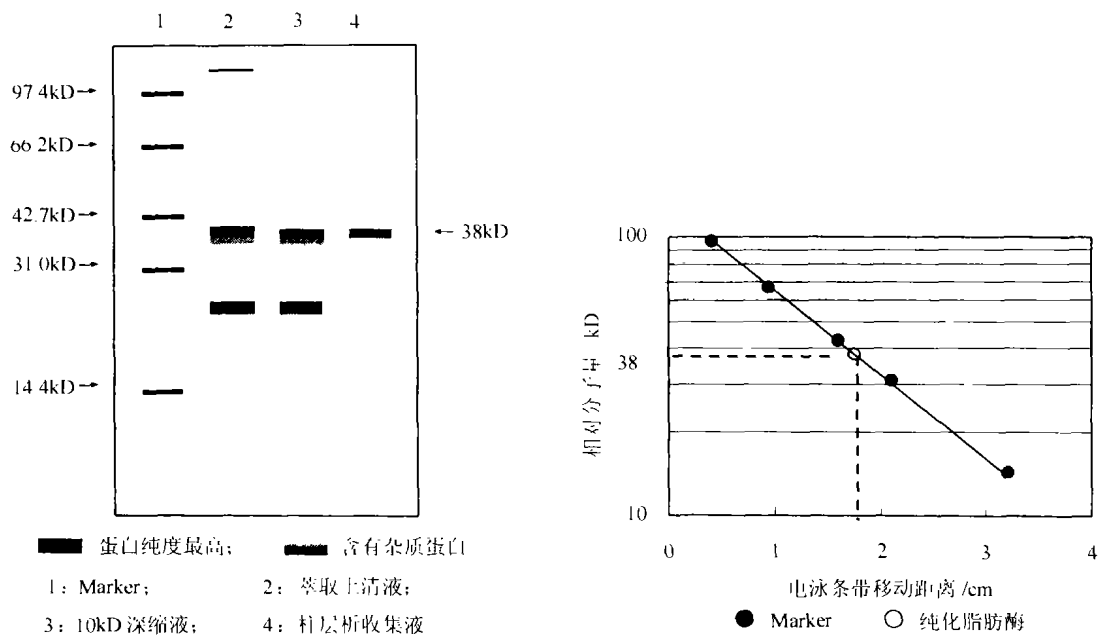


图3 纯化脂肪酶的 SDS-PAGE 电泳模式图

Fig.3 SDS-PAGE assay of purified lipase

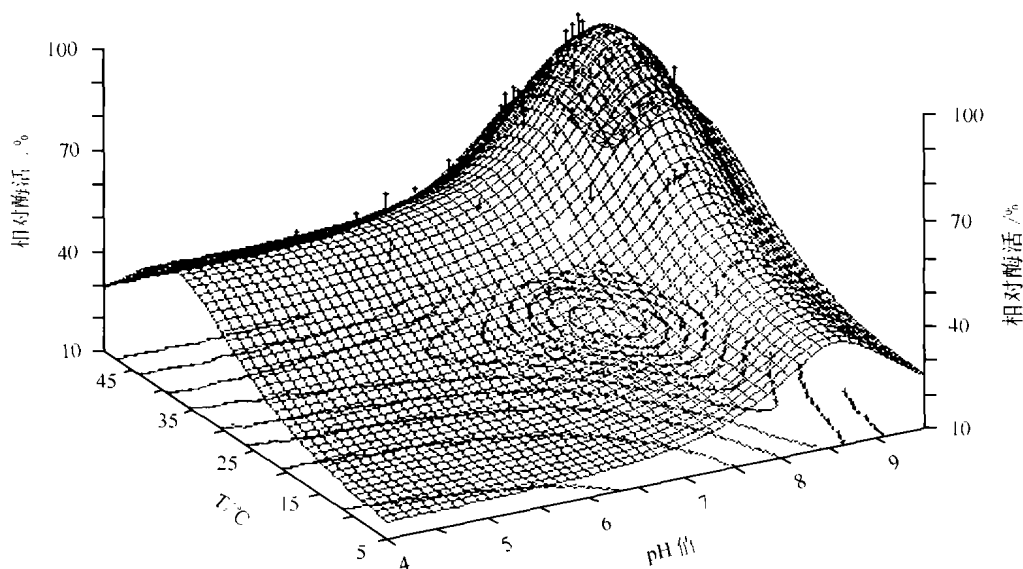


图4 温度和 pH 值对脂肪酶活力的影响

Fig.4 Effect of temperature and pH on lipase activity

酶活曲线密集,脂肪酶活力迅速降低;在低温下脂肪酶随温度变化活力下降缓慢,5℃仍具有活力,其相对酶活不低於 20%。因此该脂肪酶为低温碱性酶(史贤俊等, 2001; Naeem *et al*, 2001)。

3.2.2 温度、pH 对脂肪酶稳定性的影响 用不同 pH 的 0.25mol/L 磷酸盐缓冲液溶解脂肪酶,分别在 23℃、30℃ 和 35℃ 下静置,每隔 15min 测定并计算脂肪酶保留活力,结果见图 5。

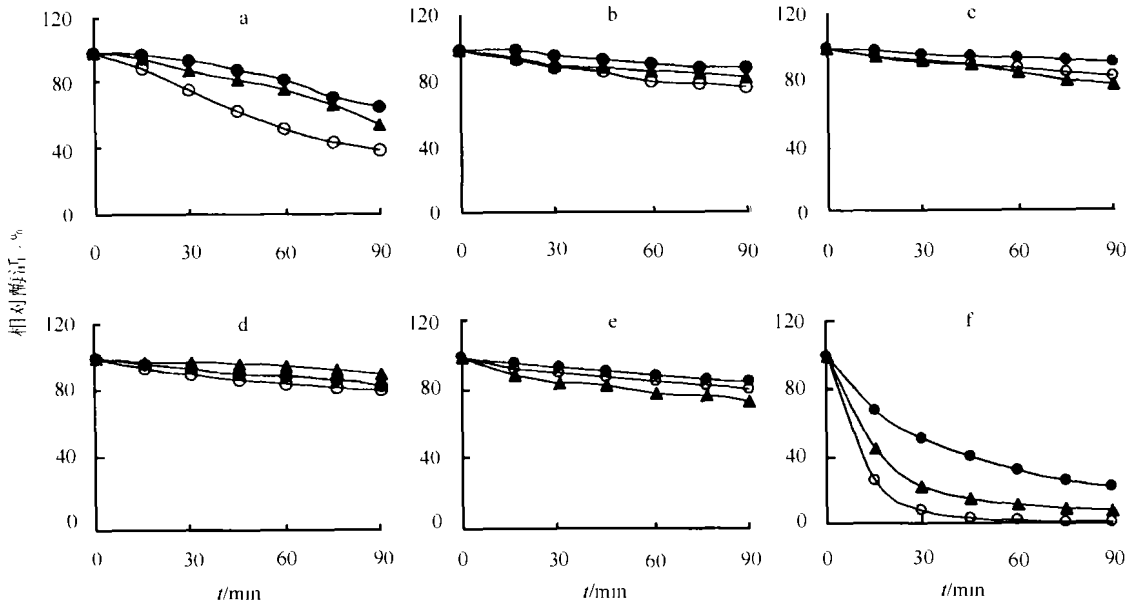


图 5 温度和 pH 值对脂肪酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature and pH on lipase stability

a. pH = 3.0; b. pH = 4.0; c. pH = 5.0; d. pH = 7.0; e. pH = 9.0; f. pH = 10.0

—●— 23℃; —▲— 30℃; —○— 35℃

由图 5 可知, 温度低于 35℃ 时, 该酶在 pH 4.0—9.0 范围内放置 90min 酶活损失不超过 20%; 于 23℃ 下放置 90min, 酶活损失不超过 10%, 因此脂肪酶在低于 35℃ 的低温下能够长时间保持酶活力, 并且酶活稳定 pH 范围为 4.0—9.0。

3.2.3 海洋微生物脂肪酶 K_m 和 V_{max} 的测定

以月桂酸对硝基苯酚酯为底物, 在 2.75ml pH 8.5 缓冲液溶剂体系中加入 0.9998% (W/V) 脂肪酶溶液 100 μ l 和底物溶液 150 μ l, 于 35℃ 环境下进行水解反应, 并计算脂肪酶的初反应速率。以底物浓度的倒数为横坐标, 反应初速率的倒数为纵坐标作图, 见图 6。据图 6 可以推算出该脂肪酶的 $K_m = 7.805\mu\text{mol/L}$, $V_{max} = 1.2385\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ 。

3.2.4 常见金属离子对海洋微生物脂肪酶活力的影响 脂肪酶测活体系中加入各种金属离子, 并保持测活反应体系中金属离子浓度为 0.1mol/L,

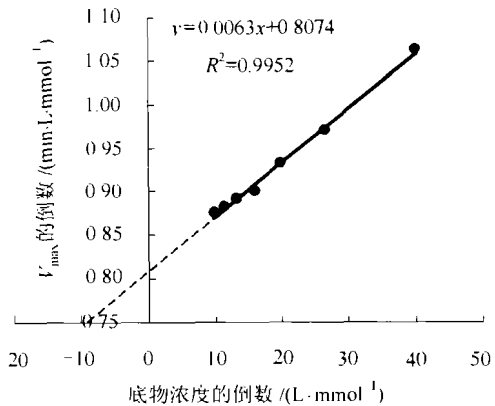


图 6 Lineweaver-Burk 法测定脂肪酶 K_m 和 V_{max} 值

Fig.6 K_m and V_{max} of lipase by Lineweaver-Burk plot

以蒸馏水作对照, 于 35℃、pH 8.5 测定脂肪酶活力, 结果见表 2。

表 2 金属离子对脂肪酶活力的影响

Tab.2 Effect of metal ions on lipase activity

金属离子浓度 (0.1mol/L)	BaCl ₂	Li ₂ SO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	MnSO ₄	Pb(Ac) ₂	AgNO ₃	FeCl ₃	ZnSO ₄	H ₂ O (对照)
相对酶活 (%)	78.57	107.14	100.00	110.00	35.50	26.84	19.48	6.70	0.90	100.00

由表 2 知,当溶液含有 Mg^{2+} 、 Li^+ 时,脂肪酶活力提高,因此 Mg^{2+} 、 Li^+ 对脂肪酶具有激活作用; Ba^{2+} 、 Ca^{2+} 对脂肪酶活力没有显著影响;而 Pb^{2+} 、 Ag^+ 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 对脂肪酶具有抑制作用,其中以 Zn^{2+} 的抑制作用最强,100mmol/L 的浓度就使脂肪酶活力完全丧失。

3.2.5 常见化学试剂对海洋微生物脂肪酶的影响 鉴于脂肪酶在洗涤剂 and 化工等行业的应

用,因此有必要对一些常见化学试剂对脂肪酶的影响进行研究。脂肪酶溶液中加入各种化学试剂,并保持试剂的浓度为:10mmol/L EDTA、10mmol/L SDS、10% 尿素、10% Tris、10% 吐温-40、10% 乙二醇、10% 丙三醇和 1% H_2O_2 ,以蒸馏水为对照于 4℃ 静置 30min。于 35℃、pH 8.5 测定脂肪酶相对活力,结果见图 7。

由图 7 知,常见化学试剂对脂肪酶具有良好

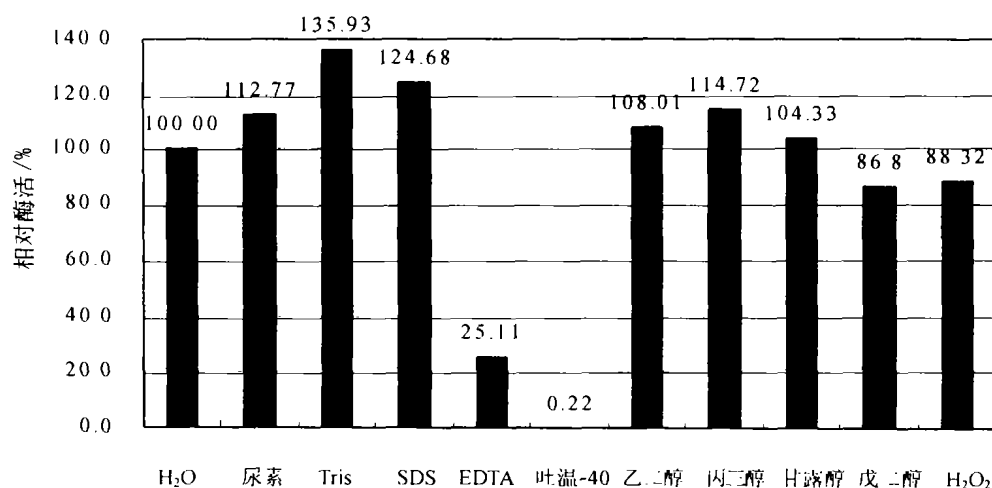


图 7 化学试剂对脂肪酶水解活力的影响

Fig.7 Effect of some chemical reagent on lipase activity

的配伍性,其中多羟基化合物对脂肪酶活力没有显著影响,因此可能对脂肪酶具有保护作用;SDS 对于脂肪酶的酶活具有一定激活作用,而非离子表面活性剂吐温-40 对脂肪酶的抑制效果显著。此外,当脂肪酶溶液中加入 10mmol/L 的 EDTA 时,脂肪酶的活性被抑制到 25.11%,由此可推测该脂肪酶的活性中心可能含有金属离子(徐岩等,2001)。

3.2.6 Zn^{2+} 离子对海洋微生物脂肪酶可逆抑制的特性

实验一:取 5 只试管加入脂肪酶溶液后再加入等体积 $ZnSO_4$ 溶液,保持其浓度分别为 5mmol/L、10mmol/L、20mmol/L 和 40mmol/L,于 4℃ 下静置 30min。以蒸馏水作对照测定脂肪酶活力,结果见图 8。

由图 8 知,当 Zn^{2+} 浓度达到 20mmol/L 时脂肪酶的活力基本丧失,因此 Zn^{2+} 完全抑制脂肪酶活力的最低浓度为 20mmol/L。

实验二:在脂肪酶溶液中加入 $ZnSO_4$ 并保持浓度为 20mmol/L,将上述溶液在 4℃ 下静置 30min

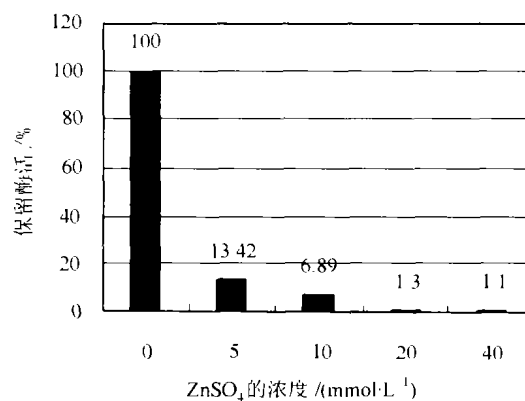


图 8 $ZnSO_4$ 对脂肪酶活力的影响

Fig.8 Effect of $ZnSO_4$ on lipase activity

后再加入等物质的量的 EDTA 二钠盐。在 4℃ 下静置 30min 并测定脂肪酶活力,脂肪酶活力可以恢复 74.2%。由此可见 Zn^{2+} 对脂肪酶具有可逆抑制作用。

由以上实验结果推测,该海洋脂肪酶在催化活性中心位置可能具有络合金属离子的基团。当加入 Zn^{2+} 后,由于金属离子占据了活性中心位置

而导致底物无法与活性中心结合,以致脂肪酶丧失催化能力。加入适量 EDTA 后,对脂肪酶产生抑制效果的 Zn^{2+} 被 EDTA 络合而与脂肪酶活性位点脱离,从而使脂肪酶催化活性得到恢复。

4 结语

对海洋微生物脂肪酶分离纯化,本研究中打破传统脂肪酶纯化工序,首次利用萃取消除诱导剂对脂肪酶纯化的影响,并大大简化了脂肪酶的纯化工序。在酶学性质研究中,发现该脂肪酶为低温碱性脂肪酶,并对高浓度金属离子(Pooja *et al.*, 2001)具有较强的耐受能力及良好的抗氧化性能等,究其原因,是由于产生该脂肪酶的微生物在长期的进化过程中,为适应海洋低温高盐的环境所致(Abel *et al.*, 1999)。特别要指出的是,本研究中筛选出对脂肪酶具有可逆抑制作用的 $ZnSO_4$, 这将可能在稳定脂肪酶活性方面发挥重要作用。以上种种特殊性能,决定该脂肪酶将作为一种新型酶制剂在工业上具有广阔的应用前景。

有关海洋微生物低温碱性脂肪酶蛋白结构和应用的研究尚在进行中,其结果以后将作进一步报道。

参 考 文 献

- 中华人民共和国轻工业部, 1993. 中华人民共和国行业标准工业酶制剂通用试验方法. QB/T 1803-93: 0—22
- 史贤俊, 林 影, 2001. 嗜冷酶及其工业应用. 生命的化学, 21(3): 248—249
- 张树政主编, 1984. 酶制剂工业(下). 北京: 科学出版社, 655—670
- 陈建平, 王绍钊, 吴松刚, 1998. 用不同类型的超滤装置浓缩提取碱性脂肪酶的研究. 食品与发酵工业, 24(4): 9—12
- 郑 毅, 施巧琴, 黄建忠等, 1999. 脂肪酶在鲭鱼鱼片脱脂中的应用研究. 福建师范大学学报, 15(1): 86—89
- 杨从发, 王淑军, 陈 静等, 2000. 海洋微生物碱性脂肪酶生产菌的分离选育. 淮海工学院学报, 9(4): 45—48
- 高 贵, 韩四平, 王 智等, 2002. 脂肪酶活力检测方法的比较. 药物生物技术, 9(5): 281—284
- 徐 岩, 李建波, 王 栋, 2001. 解脂假丝酵母脂肪酶的纯化及性质研究. 无锡轻工大学学报, 20(3): 257—260
- Abel H, Marie D Jonzo, Danielle Druet *et al.*, 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 80—87
- Alquati C, De Gioia L, Santarossa G *et al.*, 2002. The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. Eur J Biochem, 269(13): 3321—3328
- Chandrasekaran M, 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. J Marine Biotechnology, 23(5): 0086—0089
- Kamini N R, Fujii T, Kurosu T *et al.*, 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus sp.* S-2. Process Biochemistry, 36: 317—324
- Laemmli U K, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head. Nature, 227: 680—685
- Lee Dong-Woo, Koh You-Seok, Kim Ki-Jun *et al.*, 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiology Letters, 179: 393—400
- Lin Shuen-Fuh, Chiou Chien-Ming, Yeh Chuan-Mei, 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Appl Environmental Microbiol, 62(3): 1093—1095
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.*, 1951. Protein measurement with the phenol folin reagent. J Biol Chem, 193: 265—275
- Naeem R, Yuji Shimada, Satoshi Ezaki *et al.*, 2001. Low-temperature lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas sp.* Strain KB700A. Applied and Environmental Microbiology, 67(9): 4064—4069
- Pooja R, Saxena R K, Rani Gupta, 2001. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. Process Biochemistry, 37: 187—192
- Saovanee D, Sudaporn Luchai, 1999. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus sp.* THL027. FEMS Microbiology Letters, 179: 241—246
- Sharma R, Soni S K, Vohra R M *et al.*, 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. Process Biochemistry, 37: 1075—1084
- Zaccone R, Caruso G, 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. Marine Environmental Res, 54(1): 1—19

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A LOW-TEMPERATURE ALKALINE LIPASE FROM MARINE MICROORGANISMS

DONG Hong-Wei, SUN Mi[†], WANG Yue-Jun[†], YU Jian-Sheng^{††}

(Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071; College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, 266042)

[†](Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

^{††}(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, 266042)

Abstract A novel alkaline lipase was purified from a marine microorganism and the major physical and chemical characteristics of this alkaline lipase were studied and reported in this paper.

Cell-free supernatant was prepared by centrifugation (4000r/min, 60min) of culture broth. After excess olive oil was extracted from the supernatant by the chloroform, the whole solution was centrifuged and some denatured proteins were removed from the supernatant. The supernatant was ultrafiltered using hollow fibers (100kD), the ultrafiltrate was then concentrated by ultrafiltration using a hollow fiber cartridge of 10kD cut off. The condensed lipase was purified 16.3-fold by means of CM Sepharose FF cationic-exchange chromatography by an elution with a linear gradient of 10mmol/L phosphate buffer (pH 3.8) containing 0.5mol/L NaCl. The purity of the purified lipase was confirmed by the presence of a single band on SDS-PAGE. The relative molecular mass of this enzyme was determined to be (38.0 ± 1) kD.

By the titrimetric method using olive oil as the substrate, characterization of the alkaline lipase was made. The lipase showed maximum activity at pH 8.5 and 35°C. When the temperature of the reaction system rose, there was a rapid decline of lipase activity; however, lipolytic activity dropped slowly with declining temperatures. 20% of lipase activity still remained at pH 8.5 and 5°C. According to the data mentioned above, lipase showed cold adapted and basophilic properties. In order to determine the K_m and V_{max} of the lipase, the lipolytic reaction was carried out using *p*-NPL as the substrate. The K_m and V_{max} of lipase under pH 8.5 and 35°C were $7.805\mu\text{mol/L}$ and $1.2385\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{min})$, respectively. The enzyme was stable between pH 4.0 and 9.0 and at temperatures up to 35°C. In further studies, lipase showed good resistance to high salinities, the concentration of metal ions was up to 100mmol/L. Furthermore, lipase was compatible to some chemical reagents. The lipase was stable in most polyhydroxy-compounds, in line with previous reports on lipases. Good resistance to the oxidant was also observed. Tween-40 could inhibit lipase activity significantly, while surfactant SDS could activate it. 10mmol/L EDTA could inhibit lipase activity seriously, it was speculated that there would be some metal ions in the active site of the lipase. When EDTA was added to the lipase standard assay system, metal ion amount was restrained or EDTA may cover the active site, thus, inactivate the lipase. In the further studies, the effect of Zn^{2+} and EDTA on lipase activity was studied. The data indicated that some essential amino acid residue, which plays a key role in the catalytic mechanism, might bind with Zn^{2+} , resulting in lipase inactivation until Zn^{2+} was chelated by EDTA.

Key words Marine microorganism, Low-temperature alkaline lipase, Separation and purification, Characterization