

超声波对脂肪酶酶学特性的影响

马歌丽¹, 董文惠², 张勇¹, 朱林¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南 郑州 450002)

(2. 郑州轻工业学院材料与化学工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 研究了超声波对脂肪酶水解橄榄油反应的影响及超声波处理后脂肪酶的酶学特性。研究表明: 超声波促进脂肪酶水解橄榄油反应的最佳条件是: 超声功率 200 W、超声频率 20 kHz、超声处理时间 8 min。在最佳超声条件下, 脂肪酶的活力有所提高, 但其最适作用 pH 和最适温度没有改变。

关键词: 超声波; 脂肪酶; 酶特性

中图分类号: TS201.2⁺5 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)08-0017-03

Effects of Ultrasonic Treatment on the Enzymatic Properties of Lipase

MA Ge-li¹, DONG Wen-hui², ZHANG Yong¹, ZHU Lin¹

(1. College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou Univ. of Light Ind., Zhengzhou 450002, China)

(2. College of Material and Chemical Engineering, Zhengzhou Institute of Light Industry, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The effects of ultrasonic treatment on hydrolysis of olive catalyzed by lipase and the enzymatic properties of lipase were researched. The results showed that, for lipase-catalyzed hydrolysis of olive, the optimal ultrasonic power, frequency and total ultrasonic time were 200 W, 20 kHz and 8 min, respectively. Under these conditions, the lipase activities were enhanced and its optimal temperature and pH value were not changed.

Key words: ultrasonic; lipase; enzyme property

脂肪酶是一类特殊的酯键水解酶, 可催化酯类化合物分解、合成和酯交换反应。脂肪酶不仅具有高度的选择性和立体专一性, 而且反应条件温和, 不需要辅酶, 副产物少, 能在异相(即油-水界面)或有机相系统中作用^[1]。脂肪酶在食品、皮革、医药和洗涤剂等工业领域中均有广泛应用^[2]。

功率超声作为一种能量形式, 可用于影响或改变媒质的性质。由超声波振动引起的与媒质的相互作用, 可以归纳为热作用、机械作用和空化作用^[3]。超声波已广泛应用于医疗、国防、畜牧业、纺织和石油等领域^[4-5]。

目前, 超声波对酶反应的作用机理尚不完全清楚。超声波对酶影响的研究主要集中在酶水解速度方面。研究表明, 适当强度的超声不仅不会使酶失活, 反而可提高酶的催化活性和酶反应产率^[6-8]。黄卓烈等^[9]研究认为超声波对酶反应的加速作用是由于超声波能量使酶分子的动能提高, 酶和底物分子的碰撞频率加大, 使得反应速度加快。朱少娟等^[10]认为, 当用超声波

作用于分散在介质中的酶分子时, 超声波所释放的能量就会促使酶分子的构象发生改变, 而酶分子构象一旦发生改变, 就意味着其生物学功能的改变。

本文主要探讨了超声功率、超声频率和超声时间对脂肪酶水解橄榄油反应的影响, 并对超声波处理后脂肪酶的酶学特性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

脂肪酶(Sigma公司); 橄榄油(深圳市嘉里粮食有限公司); 聚乙烯醇(上海埃波化学试剂厂); KS-900超声波细胞破碎仪(宁波科生仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪酶水解橄榄油反应体系

在以前实验基础上确定了脂肪酶水解橄榄油的反应条件为: pH 7.73, 温度40℃, 底物浓度20%, 酶浓度4 mg/mL。

1.2.2 最佳超声条件的研究

将超声波发生器探头插入反应液的固定深度, 冰浴保持反应体系温度恒定, 反应液总体积不变, 在其它参数恒定的情况下, 分别改变超声波的输出功率、

收稿日期: 2007-04-22

基金项目: 河南省科技厅科技攻关项目(0324230007)

作者简介: 马歌丽(1963-), 女, 副教授, 主要从事食品与生物工程研究。

超声频率和超声处理时间,反应15 min后,测定脂肪酶的活力。

1.2.3 超声波对脂肪酶学特性的影响

在最佳超声条件下,分别改变反应体系的作用pH和温度,测定脂肪酶的活力。

1.3 分析方法

1.3.1 脂肪酶活力测定:橄榄油乳化法^[11]。

1.3.1.1 酶活定义

以每分钟催化底物产生 1 μmol 游离脂肪酸所需要的脂肪酶量定义为一个脂肪酶活力单位(U)。

1.3.1.2 酶活测定

在试管中加入 5 mL 橄榄油乳化液和 4 mL 缓冲液,40 $^{\circ}\text{C}$ 预热 5 min,加入 1 mL 酶液,保温反应 10 min 后立即加入 15 mL 95%乙醇终止反应,再加入 15 mL 水稀释,用经标定的 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定水解产生的游离脂肪酸,用 pH 电极指示滴定终点,记录消耗的 NaOH 体积。同时做空白对照实验,即在预热后先加入 95%乙醇终止剂再加入酶液,其它操作同样液。

1.3.1.3 酶活计算

$$\text{酶活 (U/mL)} = \frac{V - V_0}{t * n} * M$$

式中 V —滴定样液所消耗的 NaOH 溶液体积, mL; V_0 —滴定空白样所消耗的 NaOH 溶液体积, mL; t —反应时间, min; n —酶液体积, mL; M —滴定时用 NaOH 溶液的浓度, mmol/L

2 结果与讨论

2.1 超声功率对脂肪酶活力的影响

其它参数恒定,改变超声输出功率,反应15 min 后测定脂肪酶的活力。超声功率对脂肪酶活力的影响结果如图1所示。

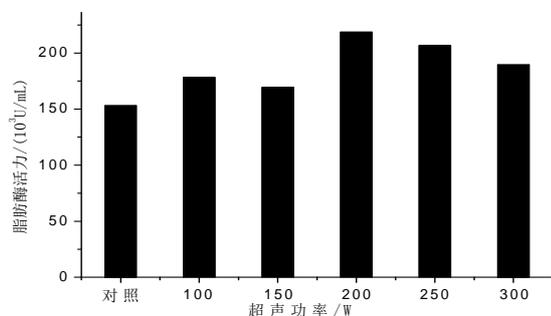


图1 超声功率对脂肪酶活力的影响

Fig.1 The effect of ultrasonic power on the lipase activity

由图1可知,超声处理后脂肪酶活力较对照组有所提高。不同超声功率对酶解反应的影响不同,超声

功率为 200 W 时酶活力最大,比对照提高了 43%。该结果与陈小丽等^[12]报道的超声波处理淀粉酶和固定化葡萄糖氧化酶后酶活力均有较大提高的结果相一致。本实验确定脂肪酶最适宜的超声功率为 200 W。

2.2 超声频率对脂肪酶活力的影响

超声输出功率为200 W,超声频率分别在20 kHz和40 kHz,反应15 min后,测定脂肪酶的活力。超声频率对脂肪酶活力的影响结果如图2所示。

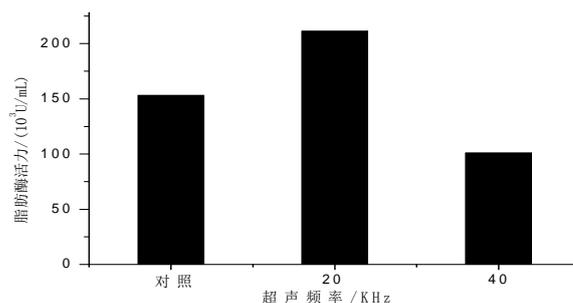


图2 超声频率对脂肪酶活力的影响

Fig.2 The effect of ultrasonic frequency on the lipase activity

由图2可见,超声频率对脂肪酶活力的影响较大。超声频率为 20 kHz 时,脂肪酶活力比对照提高 39%,而超声频率为 40 kHz 时,脂肪酶活力低于对照。本实验确定最适宜的超声频率为 20 kHz,与黄卓烈等^[9]的实验结果较接近。

2.3 超声处理时间对酶解反应的影响

超声波输出功率为 200 W,频率为 20 kHz,分别反应不同的时间,测定脂肪酶的活力。超声处理时间对脂肪酶活力的影响结果如图3所示。

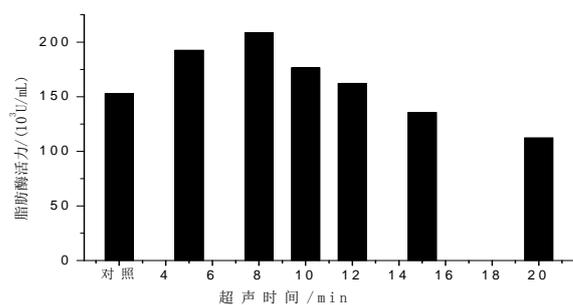


图3 超声时间对脂肪酶活力的影响

Fig.3 The effect of ultrasonic time on the lipase activity

从图3可以看出,在超声处理 8 min 内,对脂肪酶酶解反应有显著加速作用,8 min 时脂肪酶活力最高,比对照提高了 35.9%。随着超声处理时间的延长,这种加速作用逐渐减弱。超声处理 15 min 后,超声场下的脂肪酶活力低于对照。说明超声波可以加速酶水

解,但超声作用时间不宜太长。本试验以 8 min 为最佳超声处理时间。

通过上述实验确定了超声波促进脂肪酶酶解反应的最佳条件为超声功率 200 W、超声频率 20 kHz、超声处理时间 8 min。

在以上实验基础上,进一步研究了超声波对脂肪酶最适作用 pH 和最适温度的影响。

2.4 超声场下溶液 pH 对脂肪酶活力的影响

在最佳超声条件下,分别调节溶液的 pH,反应 10 min,测定脂肪酶的活力。超声场下溶液 pH 对脂肪酶活力的影响结果如图 4 所示。

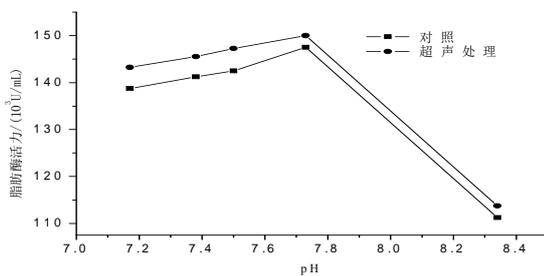


图 4 超声对脂肪酶作用 pH 的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic treatment on pH of lipase

由图 4 可见,与对照相比,超声场对脂肪酶的作用 pH 影响不大。虽然酶在一定的 pH 范围内活力略有提高,但脂肪酶的最适宜作用 pH 没有发生变化。该结果与 Sakaklbara 等^[13]对超声条件下蔗糖酶水解蔗糖的研究结果一致。

2.5 超声场下温度对脂肪酶活力的影响

在最佳超声条件下,分别在不同温度下测定脂肪酶的活力。超声场下温度对脂肪酶活力的影响结果如图 5 所示。

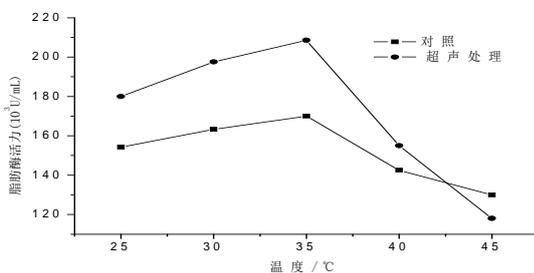


图 5 超声对脂肪酶作用温度的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic treatment on temperature of lipase

由图 5 可知,在 25 °C~40 °C 范围内,经过超声处理的脂肪酶活力显著提高;45 °C 时,脂肪酶活力低于对照组。由此也可以看出,虽然超声场下脂肪酶的温

度曲线发生了较显著变化,但其最适作用温度范围没有发生改变。

3 结论

通过超声功率、超声频率和超声时间对脂肪酶水解橄榄油反应的影响研究,得到超声波促进脂肪酶催化水解橄榄油反应的最佳条件是:超声功率 200 W、超声频率 20 kHz、超声处理时间 8 min。在最佳超声条件下,虽然脂肪酶的活力有所提高,但其最适作用 pH 和最适温度没有改变。

参考文献

- [1] 李香春,甄宗园.脂肪酶特性及其应用[J].粮食与油脂,2003,8(3):19-22
- [2] 马歌丽,彭新榜,陈海明.微生物脂肪酶及其催化合成芳香酯研究进展[J].郑州轻工业学院学报(自然科学版),2002,17(3):50-52
- [3] 谢振伟,但德忠,赵燕,等.超声波辅助萃取技术在样品预处理中的应用[J].化学通报,2005,68:1-3
- [4] Lavandier, B., Jossinet, J., Cathignol, D. Quantitative assessment of ultrasound-induced resistance change in saline solution [J]. Med.Biol. Eng. Comput., 2000, 38:150-155
- [5] Stanley B., Barnett. The Sensitivity of Biological Tissue to Ultrasound[J].Ultrasound in Medicine and Biology, 1997, 23(6):805-812
- [6] 宿哲然,李新华,金螺.超声波对蛋清蛋白酶解的研究[J].食品科技,2006.12:73-75
- [7] 黄永春,谢清若,容元平等.超声作用下淀粉酶降解壳聚糖的研究[J].食品科技,2006.10:73-77
- [8] 朱国辉,黄卓烈,徐凤彩,等.超声波对菠萝蛋白酶活性和光谱的影响[J].应用声学,2003,22(6):10-14
- [9] 黄卓烈,林茹,何平等.超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活性的影响[J].中国生物工程杂志,2003.23(4):89-93
- [10] 朱少娟,施用晖,乐国伟.超声波对胰蛋白酶水解酪蛋白的影响[J].食品与生物技术学报,2005,24(1):51-53
- [11] 高贵,韩四平,王智,等.脂肪酶活力检测方法的比较[J].药物生物技术,2002,9(5):281-284
- [12] 陈小丽,黄卓烈,巫光宏,等.超声波对淀粉酶催化活性的影响[J].华南农业大学学报,2005,26(1):76-79
- [13] Sakaklbara M,Wang D,Takahashi R,et al. Influence of ultrasound irradiation on hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase [J].Enzyme Microb Technol,1996,18:444-448