

一种新型脂肪酶的反应特性及动力学研究

周璐¹, 杨继国¹, 王永华², 刘耘¹, 杨博¹

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文对一种具有高度特异磷脂酶活力的新型脂肪酶的反应特性和动力学进行了研究。此酶可同时作脂肪酶和磷脂酶使用。作脂肪酶使用时, 始初时酶活最高的条件是: pH 值为 7.0, 温度为 40 °C; 作磷脂酶使用时, 始初时酶活最高的条件是: pH 值为 5.0, 温度为 60 °C。该酶在 pH 4.0~9.0 范围内稳定, 50 °C 时稳定性较好, 其水解甘油三酯的酶活 24 h 为 79.80%, 水解磷脂的酶活 24 h 为 61.1%; 60 °C 时酶活的稳定性变差, 其水解甘油三酯的酶活 15 min 为原酶的 17%; 水解磷脂的酶活 1 h 为原酶的 26.39%, 5 h 为 13.89%。对其动力学和热力学常数进行了测定和计算, 得知在各自始初酶活最高的条件下该酶对磷脂的催化效率高于对甘油三酯的催化效率。脱胶实验验证此酶可用于菜籽油脱胶。

关键词: 酶学性质; 动力学; 热力学; 酶法脱胶

中图分类号: TS201.2⁺5; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)09-0008-04

Research on Enzymatic and Kinetic Characteristics of a New Lipase

ZHOU Rong¹, YANG Ji-guo¹, WANG Yong-hua², LIU Yun¹, YANG Bo¹

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The enzymatic and kinetic properties of a new lipase with high specific phospholipase activity were explored in this work. It can catalyze the hydrolysis of both lipids and phospholipids. For its lipase activity, the optimum pH value and temperature were 7.0 and 40 °C, respectively, while the best pH value and temperature for its phospholipase activity were 5.0 and 60 °C, respectively. The enzyme was stable within the pH value range of 4.0~9.0 and at 50 °C. Its lipase activity and phospholipase activity reduced to 79.80% and 61.1% respectively at 50 °C for 24 h. However, it was found unstable at 60 °C as only 17% of its lipase activity remained at 60 °C for 15 min and its residual phospholipase activity at 60 °C for 1 h and 5 h were found to be 26.39% and 13.89%, respectively. The kinetic and thermodynamic parameters for the lipase catalyzed reactions were determined and the results indicated that the catalysis efficiency of the enzyme in triglyceride hydrolysis was higher than that in phospholipids hydrolysis, which was demonstrated by its capability in catalyzing the degumming of rapeseed oil.

Key words: Enzymatic Characteristics; thermodynamics; kinetics; enzymatic degumming

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 在洗涤剂、油脂化学、有机化工、制药等领域有着重要的作用。一般脂肪酶在普通条件下均具有一定的磷脂酶 (EC 3.1.1.4 和 EC 3.1.1.32) 的活力, 不同的脂肪酶其磷脂酶的活力不同。脂肪酶的磷脂酶活性可受外界环境的调控, 在特定的条件下, 脂肪酶甚至可以表现出高度特异的磷脂酶活力, 该性质大大提高了脂肪酶的应用价值, 扩大了其应用范围, 利用脂肪酶的该性质可以进行磷脂的酶法改性, 可进行植物油酶法脱胶, 替代化学脱胶而实现环保性能和经济性能的提高^[1]。

本实验室对一种新型脂肪酶 (Lecitase® Ultra) 进

收稿日期: 2007-05-30

基金项目: 国家自然科学基金 (20506007)

作者简介: 周璐, 女, 硕士

通讯作者: 杨博, 男, 副教授

行了研究。此酶是一种基因工程改造的脂肪酶, 来源于 *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*, 该酶表现出高度特异的磷脂酶 A₁ 活力, 能特异性水解断裂磷脂的 sn-1 位酯键, 生成溶血磷脂和脂肪酸^[2]。本实验室已经和 Novo 公司共同对此酶的应用进行了大量的研究^[3,4]。本文对该酶的酶学性质和底物反应动力学等特性及脱胶应用进行了研究, 不仅为脂肪酶对磷脂催化特异性的基础研究提供理论基础, 并可指导其在工业生产中的更好应用。

1 材料与方法

1.1 材料

脂肪酶: Novonodisk 公司提供; 大豆浓缩磷脂: Centrol® 3F-UB, 美国中央大豆公司, 购自上海康诺执信有限公司; 其它试剂: 聚乙烯醇 (PVA)、乙醇、橄

榄油等皆为析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 酶活性测定

1.2.1.1 脂肪酶活性测定

脂肪酶活力测定采用橄榄油乳化法^[5]，脂肪酶活力单位 (U) 定义为每分钟分解底物释放出 1 μmol 游离脂肪酸所需要的酶量。

1.2.1.2 磷脂酶活性测定

磷脂酶活性测定参照脂肪酶活性测定方法。1 mL 稀释的酶液加入 25.00 g 底物溶液中，反应 20 min，以 95% 乙醇终止反应，于自动滴定仪(法国 Radiometer TitraLab 845) 下用 NaOH 标准溶液滴定。同时进行空白对照试验，空白样预先加入乙醇。试验测定值取两次试验的平均值。单位磷脂酶活力 (U) 定义为在测定条件下每分钟分解底物释放出 1 μmol 游离脂肪酸所需要的酶量。

1.2.2 pH 和温度对酶活性和酶稳定性的影响

1.2.2.1 pH 和温度对酶活性影响

适当稀释酶液，于不同 pH 的缓冲体系中分别在不同温度下测定其水解酶活。

1.2.2.2 pH 和温度对酶稳定性的影响

以 pH 4~9 的缓冲液分别稀释酶液，25 $^{\circ}\text{C}$ 保温 24 h 后，测定其残余的水解酶活 (以此批处理中酶液活力最高为对照，并将所有数据折算成其比值的百分率)。

将稀释的酶液置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中，每隔一定时间取样测定其残余水解酶活 (以此批处理中酶液活力最高为对照，并将所有数据折算成其比值的百分率)，pH 控制在最适值。

1.2.3 底物反应动力学参数的测定

固定酶浓度，对不同浓度的底物溶液，测定其反应初速度，再根据 Linewear-Burk 作图法求出该酶对底物的 K_m 值及对应的最大反应速率 V_{max} 及相关动力学常数。

1.2.4 酶法油脂脱胶试验

1.2.4.1 脱胶实验

300 g 毛油为底物，加入 45% 柠檬酸 0.36 mL，10000 r/min 均质 1 min，80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中 500 r/min 机械搅拌 20 min。冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$ ，加入一定量 4% NaOH 调 pH 至 5.0，加入少量水和 20 倍稀释的酶液，60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应，定时取样分析。

1.2.4.2 磷含量和脂肪酸含量分析

油相中磷含量分析参照 AOCS Ca 12-55 进行^[6]。脂肪酸含量测定参照 AOCS Ca 5a-40 进行^[6]，每个样平行测定 3 次。

2 结果与讨论

2.1 pH 对酶活性的影响

以缓冲液适当稀释酶液，分别在 pH 4~9 的缓冲体系中测定该酶的两类活性的水解酶活。结果见图 1、图 2，用作脂肪酶时，pH 7.0 时其初始酶活最高；用作磷脂酶时，pH 5.0 时其初始酶活最高，pH 5.0~7.0 范围内酶活力变化曲线较平稳，超过 7.0 时，酶活力迅速下降。

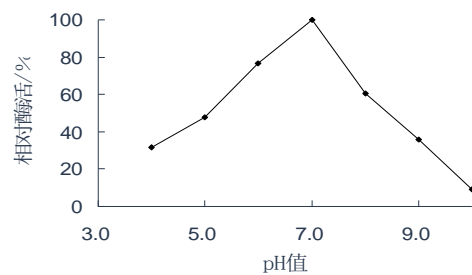


图 1 pH 值对催化水解甘油三酯活力的影响

Fig.1 Effect of pH on activity to Triglyceride structures

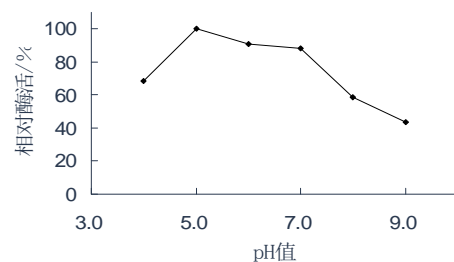


图 2 pH 值对催化水解磷脂活力的影响

Fig.2 Effect of pH on activity to phospholipids

2.2 温度对酶活性的影响

分别在酶活最高的 pH 的缓冲体系中，改变反应温度测定了酶的水解活力，其结果如图 3、图 4 所示。

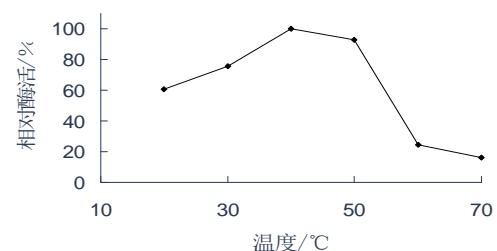


图 3 温度对催化水解甘油三酯活力的影响

Fig.3 Effect of temperature on activity to triglyceride structures

从图 3、图 4 可看出，在 20 $^{\circ}\text{C}$ 时，酶活较低，随着温度的升高反应速度渐渐加快。用作脂肪酶时，在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时其催化水解甘油三酯的初始活性最高，温度再往上升酶的失活温度系数的影响迅速加大，超过 60 $^{\circ}\text{C}$ 时活力迅速下降，70 $^{\circ}\text{C}$ 时接近完全失活。用作磷脂酶

时, 60 °C左右时其初始酶活最高, 但温度继续升高时酶活迅速下降, 至 80 °C时, 酶接近完全失活。

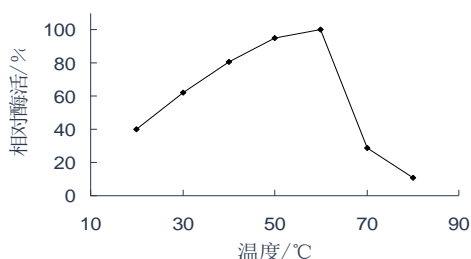


图 4 温度对催化水解磷脂活力的影响

Fig.4 Effect of temperature on activity to phospholipids

2.3 温度对酶稳定性的影响

将 pH 7.0 缓冲液配制的稀释 1000 倍的酶液置于 50、60 °C水浴中放置 24 h, 每隔一定时间, 测定其水解甘油三酯的酶活; 将 pH 5.0 缓冲液配制的稀释 1000 倍的酶液置于 50、60 °C水浴中放置 24 h, 每隔一定时间测定其水解磷脂的酶活。其结果如图 5、图 6 所示。

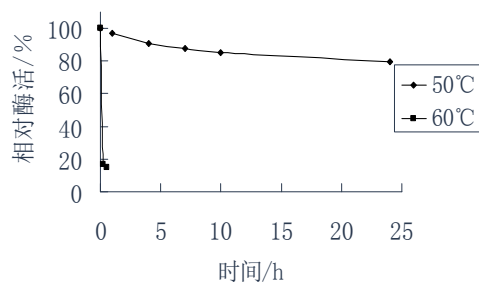


图 5 温度对催化水解甘油三酯活力稳定性的影响

Fig.5 Effect of temperature on stability towards Triglyceride structures

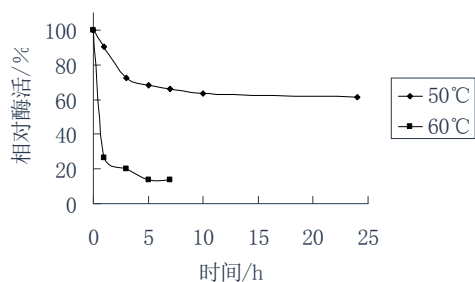


图 6 温度对催化水解磷脂活力的稳定性的影响

Fig.6 Effect of temperature on stability towards phospholipids

由图 5、图 6 可知, 50 °C时酶活稳定性较好, 催化水解甘油三酯时 24 h 为原酶的 79.80%, 催化水解磷脂的活力 24 h 为原酶的 61.1%。60 °C时酶活稳定性较差, 催化水解甘油三酯的活力 15 min 为原酶的 17%; 催化水解磷脂的活力稍稳定, 1 h 为原酶活的 26.39%, 5 h 为 13.89%,

2.4 底物反应动力学常数

为了研究 Lecitase Ultra 对两种底物的选择特异性, 对其反应动力学进行了研究。分别在初始酶活最高的条件下, 改变底物浓度, 测定酶反应初速度, 以酶反应初速度对底物浓度作 Lineweaver-Burk 双倒数图, 见图 7、图 8, 求得该酶水解甘油三酯和磷脂的 K_m 和 V_{max} 值及相关动力学常数 (表 1)。

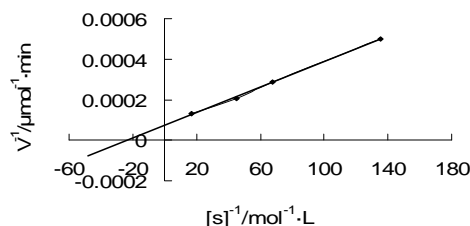


图 7 催化水解甘油三酯的 Lineweaver-Burk 图

Fig.7 Lineweaver-Burk plots of activity towards triglyceride structures

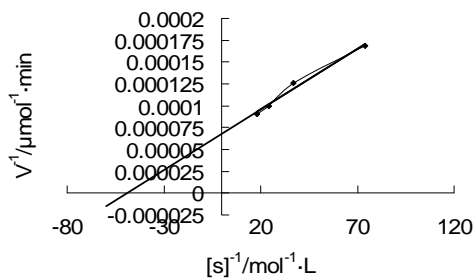


图 8 催化水解磷脂的 Lineweaver-Burk 图

Fig.8 Lineweaver-Burk plots of activity towards phospholipids

表 1 催化水解反应的动力学常数

Table 1 The kinetic parameters when catalyzing reactions		
	脂肪酶活性	磷脂酶活性
K_m / mmol/L	48.232	18.641
V_m / mmol/min	15.025	13.967
K_{cat} / s ⁻¹	0.00228	0.00582
K_{cat}/K_m / (mol ⁻¹ ·L·s ⁻¹)	0.0473	0.313

K_m 值大小与酶的性质有关, K_m 值越小表示酶和底物的亲和力越大, 从该结果可以得知在初始酶活最高的条件下, 磷脂与 Lecitase Ultra 的亲和力较大; K_{cat} 为转换数, K_{cat} 值越大, 表示酶的催化效率越高, K_{cat}/K_m 是酶和底物形成产物的表观二级速率常数, 也称专一性常数, 可以比较不同酶或同一种酶催化不同底物的催化效率, K_{cat}/K_m 越大, 催化效率越高, 水解磷脂的 K_{cat} 值、 K_{cat}/K_m 值远大于催化甘油三酯的值, 表明在各自初始酶活最高的条件下, 水解磷脂的效率要大大高于水解甘油三酯的效率。

2.5 脱胶实验

对该酶应用于菜籽油脱胶进行了研究,加入柠檬酸进行酸处理后,菜籽油中磷含量从 170.6 mg/kg 减少为 34.7 mg/kg,加入酶继续反应,2 h 后,加酶样中磷含量迅速下降,5 h 后油相中磷含量降为 7.0 mg/kg。

按照每个磷脂分子分解出一个脂肪酸分子计算,油相中磷含量减少 100 mg/kg,脂肪酸则会增加 0.1%^[5]。实验发现脂肪酸的增加量和油相中磷含量的减少量相吻合,在脱胶的过程中,酶选择的底物大部分为磷脂,证实了可用于菜籽油脱胶。

3 结论

3.1 Lecitase® Ultra 是一种具有高度特异磷脂酶活力的新型脂肪酶。

3.2 作为磷脂酶使用时,其初始酶活最高的条件是: pH 5.0,温度为 60 ℃;作为脂肪酶使用时,其初始酶活最高的条件是: pH 7.0,温度为 40 ℃。

3.3 该酶在 pH 4.0~9.0 范围内稳定,50 ℃时酶活稳定性较好,催化水解甘油三酯时 24 h 为原酶的 79.80%,催化水解磷脂的活力 24 h 为原酶的 61.1%。60 ℃时酶活稳定性较差,催化水解甘油三酯的活力 15 min 为原

酶的 17%;催化水解磷脂的活力稍稳定,1 h 为原酶活的 26.39%,5 h 为 13.89%。

3.4 从其动力学基本常数的研究发现,在各自初始酶活最高的条件下,水解磷脂的效率要大大高于水解甘油三酯的效率。

3.5 可用于菜籽油的脱胶。

参考文献

- [1] 杨继国,杨博,李秋生,等.新型磷脂酶Lecitase® Ultra用于菜籽油脱胶的研究[J].中国油脂,2003,28(12):31-34
- [2] 孟庆飞,温其标.磷脂酶法改性.河南工业大学学报(自然科学版).2005,26(5):89-92
- [3] Yang Ji-guo, B. Yang, Q. Li. Rapeseed Oil Degumming by Lecitase® Ultra. China Oils and Fats. 2003,28(12):31-34
- [4] Yang Ji-guo, B. Yang, J. Meng. Soybean Oil Degumming by a Novel Phospholipase Lecitase® Ultra. China Oils and Fats,2003,28 (10):10-13
- [5] Ji-Guo Yang, Yong-Hua Wang, Bo Yang, Geoffrey Mainda, Yong Guo. Food Technol.Biotechnol.2006,44(1):101-104
- [6] Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, AOCS, Champaign,1997

(上接第 14 页)

母细胞生长及发酵代谢的关系进行分析后,选择 KH_2PO_4 为培养基中的基本成分之一。然后采用正交试验对确定下来的培养基的基本成分配比进行优化。优化后, GSH 产量提高到 148.547 mg/L,较优化前提高了 16.2%。

参考文献

- [1] 于景芝.酵母生产与应用手册[M].北京:中国轻工业出版社,2005
- [2] 陈坚,卫功元,李寅,等.微生物发酵法生产谷胱甘肽[J].无锡

轻工大学学报,2004,23(5):104-110

- [3] 陈坚.微生物重要代谢产物—发酵生产与过程解析[M].北京:化学工业出版社,2005.6:71-80
- [4] 施巧琴,吴松刚.工业微生物育种学(第二版)[M].北京:科学出版社.2003
- [5] 刘娟,刘春秀,王雅琴,等.发酵法生产谷胱甘肽的研究进展[J].微生物学通报,2002,29(6):72-75
- [6] 童群义,陈坚,李华钟.高产谷胱甘肽的酵母菌选育及其培养条件研究[J].工业微生物,2002,32(2):13-17
- [7] 杜连祥,路福平.微生物学实验技术[M].北京:中国轻工业出版社,2005

电脑族的四杯抗辐射茶

面对电脑时间长了不好,那该怎么办?其实每天四杯茶,不但可以对抗辐射的侵害,还可保护眼睛。

1.上午一杯绿茶:绿茶中含强效的抗氧化剂以及维生素 C,不但可以清除体内的自由基,还能分泌出对抗紧张压力的荷尔蒙。绿茶中所含的少量咖啡因可以刺激中枢神经,振奋精神。不过最好在白天饮用,以免影响睡眠。

2.下午一杯菊花茶:菊花有明目清肝的作用,或在菊花茶中加入蜂蜜,对解郁有帮助。

3.疲劳了一杯枸杞茶:枸杞子含有丰富的β胡萝卜素、维生素 B1、维生素 C、钙、铁,具有补肝、益肾、明目的作用。其本身具有甜味,可以泡茶也可以像葡萄干一样作零食,对解决“电脑族”眼睛涩、疲劳都有功效。

4.晚间一杯决明茶:决明子有清热、明目、补脑髓、镇肝气、益筋骨的作用