褶皱假丝酵母脂肪酶催化反应条件的研究

陈贵佺，郑二丽
（广州市凯虹香精香料有限公司，广东广州 510550）

摘要：本文研究了褶皱假丝酵母脂肪酶的催化反应条件。通过单因素试验研究了温度、缓冲液 pH 值、酶的浓度对酶活性的影响，并通过正交设计实验对单因素得到的结果进行优化，得到了褶皱假丝酵母脂肪酶的最适反应条件，即温度 55 ℃、缓冲液 pH 值 6.0、酶的浓度 100 mg/mL，在此条件下，获得的 100 mg/mL CRL 酶的活力为 39.78 mU，CRL 酶适合在 60 ℃以下温度环境中进行反应，并且适合保藏在 pH 值 5.0~7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中。

关键词：脂肪酶；阿魏酸乙酯；酶活
文章篇号：1673-9078(2013)4-826-828

Catalytic Activity of *Candida rugosa* Lipase

CHEN Gui-quan, ZHENG Er-li
(Guangzhou Kaihong Flavor & Fragrance Co., Ltd, Guangzhou 510550, China)

Abstract: In this paper, the activity of *Candida Rugosa* lipase (CRL) in catalyzing hydrolysis reaction was investigated through single factor experiment. And the optimal reaction conditions for CRL catalyzed hydrolysis were obtained as follows: temperature 55 ℃, buffer pH 6.0, and enzyme concentration 100 mg/mL. Under these conditions, the activity of 100 mg/mL CRL was 39.78 mU. CRL was suitable for catalysis at temperatures below 60 ℃and was stable when stored in buffer solution at pH values of 5.0~7.0.

Key words: lipase; ethyl ferulate; enzyme activity

脂肪酶是一类可以催化甘油三醋合成和分解的酶的总称，主要水解由甘油和 12 个碳原子以上的不溶性长链脂肪酸形成的甘油酯[1]。它同时还可以催化酯交换反应，广泛分布于动物、植物和微生物组织和器官中[2]。天然底物是油脂，具有对油/水界面的亲和力，能在油/水界面上催化酯水解或醇解、醋合成、酯交换、内酯合成、多酯合成、高聚物合成及立体异构拆分等有机合成反应，广泛应用于皮革、皮毛、绢纺、食品、医药等行业，特别在洗涤剂、油脂化学、有机化工、制药等领域有着重要的作用[3]，是目前被重点研究的酶催化剂。脂肪酶可以用于催化酯交换反应、生物表面活性剂的合成[4]、多酯合成[5]、聚合物的合成[6]和药物的合成等，尤其是利用某些脂肪酶的立体专一性，催化旋光异构体的拆分[7]和手性药物的合成[8]成为酶工程领域研究的新热点。因而脂肪酶及其改性制剂在食品与营养、日用化学工业、油脂化学品工业、农业化学工业、造纸工业、洗涤和生物表面活性剂的合成、以及药物合成等许多领域得到了广泛应用。褶皱假丝酵母脂肪(*Candida rugosa* lipase，CRL)广泛应用于化工制药、油脂、食品等传统与现代工业，是目前全世界工业应用最广泛的商品化脂肪酶之一。

收稿日期：2012-12-13
作者简介：陈贵佺(1984-)，男，工程师，硕士研究生，食品生物技术

本文通过研究褶皱假丝酵母脂肪酶的催化反应活性并获得了它的最适反应条件，目的是进一步扩展该种脂肪酶的应用领域。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

高效液相色谱仪 HP1100，安捷伦公司；褶皱假丝酵母脂肪酶(*Candida rugosa* lipase，CRL)，Sigma 公司；阿魏酸，国药集团公司；阿魏酸乙酯，盐城朗德公司；柠檬酸、磷酸氢二钠，汕头市西陇化工厂。

1.2 方法

1.2.1 不同 pH 值阿魏酸乙酯溶液的配制

分别称取阿魏酸乙酯 0.0045 g 于试剂瓶中，加入 20 mL pH 值为 4.0、6.0、8.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，微型漩涡混合仪振荡 10 min 即得所需溶液。

1.2.2 酶液的制备

分别称取一定质量的 CRL 脂肪酶，加入 20 mL 一定 pH 值的缓冲液，微型漩涡混合仪混合均匀后，4 ℃，10000 r/min 离心 20 min，于 4 ℃下保存，用时取其上清液。

1.2.3 CRL 酶活的测定

本实验的酶活采用 HPLC 法来测定，色谱条件：流动相为甲醇:水:冰醋酸=30:69.5:0.5 (V:V:V)，流速

0.9 mL/min，紫外检测器，检测波长318 nm，色谱柱为ODS-C18柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，柱温为室温，进样量为20 μL。

取100 mg/mL的酶液250 μL放入EP管中，于一定温度的恒温水浴中保温3 min，然后加入250 μL阿魏酸乙酯溶液，55 ℃温度下精确反应10 min后取出，立即加入250 μL冰乙酸。在上述色谱条件下进行测定。以250 μL煮沸失活的酶液为空白样，其它的步骤与上述相同。

酶活定义：在一定温度，一定pH值条件下，每分钟生成1 μmol阿魏酸所需酶量定义为1个酶活力单位(U)。

酶活力(U/mL)=W×Df×1000 /194.19×10×0.25

注：W：酶解反应产生的阿魏酸量(mg)；Df：表示稀释度；1000：将mg转化成μg所乘的系数；194.19：表示阿魏酸的分子量(mg/mmol)；10：反应时间；0.25：与底物反应的待测酶液量。

1.2.4 CRL酶的热稳定性和pH稳定性

用不同pH值(3.0~9.0)的缓冲液将CRL酶配制成100 mg/mL的酶液，室温放置24 h，然后回调pH值至6.0测定残留酶活。在测定酶的热稳定性时，将浓度为100 mg/mL的酶液分别放置于不同的温度(20~80 ℃)下60 min，取出后调节温度至55 ℃，然后在此温度下测定酶活。

2 结果与分析

2.1 温度对酶活的影响

酶对温度的敏感性一般都很强，适当提高反应的温度，可提高酶的活性，有助于反应向正反应方向进行。另一方面，过高的反应温度，对酶的空间结构影响较大的，使酶活降低并减少酶的使用寿命，促使酶的反应速度不是增大反而减小。温度对脂肪酶CRL催化反应的影响如图1所示。

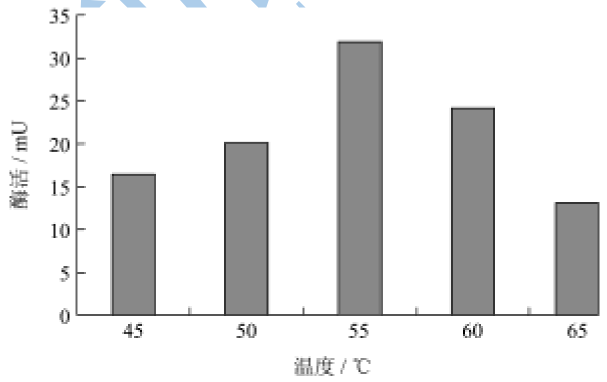

图1 温度对酶活的影响

Fig.1 Effect of temperature on enzyme activity

由图1可以看出，在较低的温度范围内，随着温度的逐渐升高，反应速度也逐步升高，意味着酶的活性也逐渐升高，当反应温度达到55 ℃时，酶的活性达到了最高值，符合一般动力学规律。当温度继续升高，催化反应速度又开始降低，酶的活性下降。由此看出：（1）随着温度的升高，底物分子运动加快，外扩散阻力减少，催化反应速率加快；（2）CRL脂肪酶在以磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液为反应体系中的催化反应最适温度为55 ℃。

2.2 pH值对酶活的影响

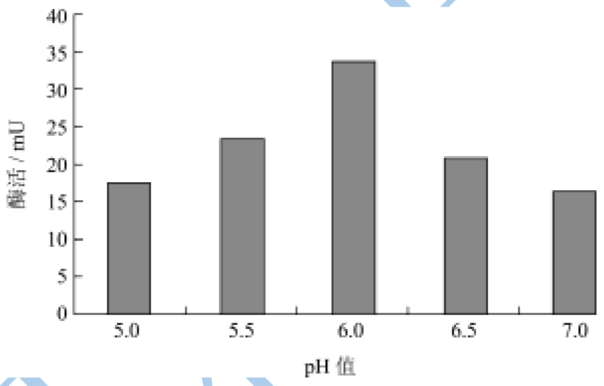

图2 pH值对酶活的影响

Fig.2 Effect of pH on enzyme activity

如图2所示随着pH值的增加，酶的活性呈先增强后减弱的趋势，当pH值在5.0~6.0时，酶的活性强度随着pH值的增加而增强，当pH值超过6.0后，酶的活性强度随着pH值的增加反而减弱。有资料显示脂肪酶分子上有许多酸性、碱性氨基酸的侧链基团[9]，它随着pH值的变化处于不同的解离状态，直接影响了底物的结合和进一步反应，进而影响酶的活性，即pH值的改变将引起酶构象的变化，导致酶的催化活力改变。因此选择该酶作用的最适pH值为6.0。

2.3 酶浓度对酶活的影响

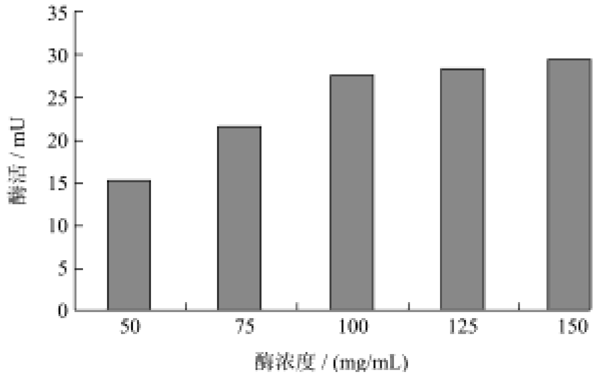

图3 酶浓度对酶活的影响

Fig.3 Effect of enzyme concentration on activity

如图3显示了酶的添加浓度对酶活的影响，由图可知酶的活性随着酶浓度的增加而增强，但当酶的添加在低浓度范围(酶浓度≤100 mg/mL)时酶活的强度与其成正线性关系，之后随着浓度的继续添加，酶活

的增长强度趋于平缓，因此该反应的最佳酶添加浓度为 100 mg/mL。

2.4 正交试验对实验结果进行优化

本实验采用正交实验来确定 CRL 酶的最佳催化条件，正交试验设计是研究多因素多水平的又一种设计方法，它是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验，这些有代表性的点具备了“均匀分散，齐整可比”的特点。正交试验设计是一种高效率、快速、经济的实验设计方法称为正交试验设计法。其特点为：①完成试验要求所需的实验次数少。②数据点的分布很均匀。③可用相应的极差分析方法、方差分析方法、回归分析方法等对试验结果进行分析，引出许多有价值的结论。对酶催化过程需考虑的主要因素：温度，酶浓度和缓冲液 pH 采用正交设计方法进行优化设计实验，其正交设计方案及结果如表 1。

表 1 正交实验结果

Table 1 Orthogonal experimental result

实验号	因素			
	A(温度/℃)	B(pH)	C[酶浓度/(g/L)]	酶活/(mU)
1	1(50)	1(5)	1(50)	16.58
2	1	2(6)	2(100)	24.85
3	1	3(7)	3(150)	21.7
4	2(55)	1	2	33.78
5	2	2	3	40.92
6	2	3	1	18.51
7	3(60)	1	3	22.02
8	3	2	1	37.31
9	3	3	2	23.92
K_1	63.13	72.38	72.40	
K_2	93.21	103.08	82.55	
K_3	83.25	64.13	84.64	
k_1	21.04	24.13	24.13	
k_2	31.07	34.36	27.52	
k_3	27.75	21.38	28.21	
R	6.71	10.23	4.08	

根据表 1，对实验结果进行分析：各因素对酶活影响的主次顺序为酶浓度>反应温度>pH 值，最优组合是 $A_2B_2C_3$。

综合分析后，得出 CRL 催化反应的最适条件为：温度 55 ℃，pH 值 6.0，酶浓度 150 mg/mL，从经济上考虑酶浓度取 100 mg/mL 为最佳。在此最优的实验条件即温度 55 ℃、pH 值 6.0、酶浓度 100 mg/mL，进行验证实验，测定获得的该酶活力为 39.78 mU，因此实验获得的最适条件可取。

2.5 酶催化反应的热稳定性

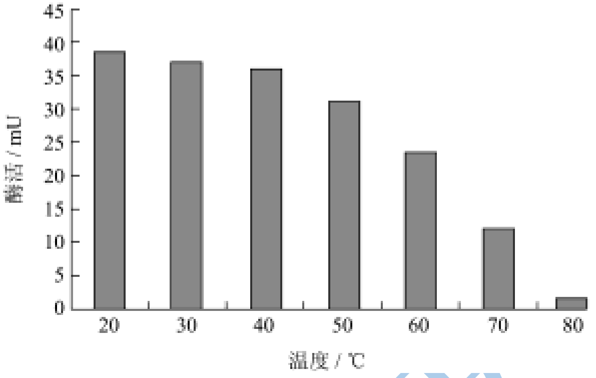

图 4 酶的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of the enzyme

从图 4 可以看出，反应温度从 20 ℃升高到 40 ℃时，酶的活性强度基本不变，只是略有下降，当温度达到 40 ℃之后，酶的活性下降幅度增大，并且温度达到 80 ℃时，酶基本失活分析原因温度太高破坏了酶的蛋白质结构，使其失去活性。因此，CRL 酶适合在 60 ℃以下温度环境进行催化反应。

2.6 酶催化反应的 pH 值稳定性

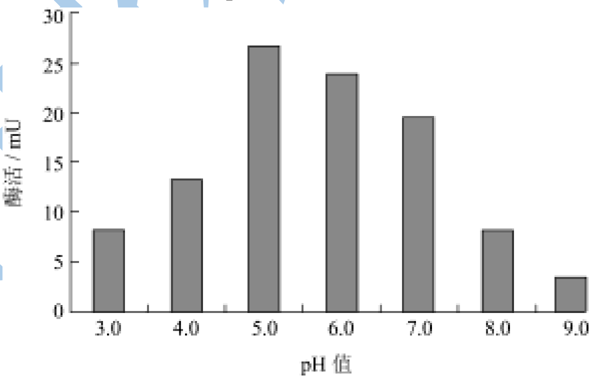

图 5 酶的 pH 稳定性

Fig.5 pH stability of the enzyme

从图5可以看出，酶在pH值5.0~7.0的缓冲溶液中保存较稳定，酶的活性略有下降，而在pH≤5.0或pH≥8.0的缓冲液中储存时，酶活性的下降幅度较大，特别在pH≥8.0的缓冲液中储存时，酶活性基本失活。这表明此酶在弱酸性环境中比较稳定，但对强酸较为敏感，对碱则更为敏感。

3 结论

本文通过单因素以及正交试验研究得出 CRL 催化反应的最适条件为：温度 55 ℃，pH 值 6.0，酶浓度 100 mg/mL，并且在此最适条件下进行验证实验，得出 100 mg/mL CRL 酶的酶活为 39.78 mU；CRL 酶适合在 60 ℃以下温度环境中进行反应，并且适合保藏在 pH 值 5.0~7.0 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中。

参考文献

[1] 董恒涛,吴晓英,刘仁春,等.假丝酵母脂肪酶催化底物水解的初步研究[J].现代食品科技,2008,24(7): 645-649

[2] ChopineauJ, Meeafferty F D, TherisodM, et al. Produetion of biosurfactants from sugar aleohols and vegetable oi1s catalyzed by lipases in a nonaqueous media [J]. Biotechnol. Bioengin, 1988, 31: 208-214

[3] 周瑢,杨继国,王永华,等.一种新型脂肪酶的反应特性及动力学研究[J].现代食品科技,2007, 23(9): 8-13

[4] Zhang L Q, Zhang YD, Xu L, et al. Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miseible organic solvents [J]. EnzemeMierob.Teehnol, 2001, 29:129-135

[5] Margolin A L, FitZPatriek P A, Dubin P L, et al. Chemenzymatic synthesis of optieally aetive (meth) acrylie polymers [J]. J. Am. Chem. Soe, 1991, 4693-4693

[6] Van Dyck SMO, Lemiere GLF, Jonekers THM, et al. kinetic resolution of adiliy drobenzo furan-type neolignan by lipase-catalysed acetylation [J]. Tetralledron: Asymetry, 2001, 12: 785-789

[7] Margolin A L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs[J]. Enzymemierob. Teehnol, 1993, 15: 266-280

[8] 朱浩,施靠.反相胶束体系中的酶学研究[J].生物化学与生物物理进展,1998,25(3):204-210

[9] 王元鸿,褚莹,刘景林,等.反胶束体系中脂肪酶催化合成异丁酸异戊酯[J].高等学校化学学报,2004,9:1468-1688

现代食品科技