

假丝酵母脂肪酶催化底物水解的初步研究

董恒涛, 吴晓英, 刘仁春, 林影

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)

摘要: 通过与一种不同来源的脂肪酶作比较, 研究了粗状假丝酵母诱变株 Z6 产脂肪酶水解不同底物的相对酶活, 包括对低级酯、脂肪酸甘油酯和天然油脂的水解。并对粗状假丝酵母 Z6 产脂肪酶催化水解玉米油和大豆油反应中的 pH 值、温度、时间、油/水比、乳化剂用量和 Ca^{2+} 浓度等因素进行了研究, 得出 pH 值为 7.5, 温度为 45 °C, 水解反应时间为 21 h, 油水比为 1/10, 乳化剂相对于油的浓度为 4%, Ca^{2+} 浓度为 75 mmol/L 时, 玉米油和大豆油都有较好的水解率。通过对该酶反应动力学进行研究得出其水解反应的米氏常数 K_m 为 12.25×10^{-3} mol/L, 最大反应速率 V_{max} 为 11.14 $\mu\text{mol}/\text{min}$ 。

关键词: 脂肪酶; 粗状假丝酵母; 水解

中图分类号: Q556; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0645-05

Hydrolysis Behavior of Lipase from *Candida valida*

DONG Heng-tao, WU Xiao-ying, LIU Ren-chun, LIN Ying

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The relative activity of a lipase from *Candida valida* Z6 was studied in hydrolysis of simple esters, fatty acid glycerides and lipidse. For the hydrolysis of corn oil and soybean oil by the lipase, the optimum hydrolysis conditions were: pH value 7.5, temperature 45 °C, hydrolysis time 21 h, oil/water ratio 1/10, emulsifying agent content of 4%_(oil) and Ca^{2+} concentration of 75 mmol/L. The enzyme kinetics analysis revealed that the K_m and V_{max} were 12.25×10^{-3} mol/L and 11.14 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively.

Key words: lipase; *Candida valida*; hydrolysis

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3, 甘油酯水解酶), 是一类特殊的酯键水解酶, 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。不同来源的脂肪酶, 其结构的差异使它们对不同底物的特异性也不同^[1]。利用脂肪酶催化天然底物油脂水解的特性可以用于脂肪酸的生产^[2]和多不饱和脂肪酸 (PUFA) 的富集^[3]。亚油酸是人体必需的多不饱和脂肪酸, 普遍存在于植物油中, 如大豆油、玉米油、棉籽油以及芝麻油等, 亚油酸具有降低血清总胆固醇等功效^[4]。应用脂肪酶从天然底物中富集 (PUFA) 的方法主要有: 酶催化水解法、二步酶法和选择性醇解纯化 PUFA^[5]。

由于脂肪酶的开发利用必须以脂肪酶对不同底物的催化水解能力及特异性为基础。本试验采用两种不同来源的脂肪酶对不同底物的水解能力进行了比较和研究, 并对脂肪酶水解大豆油和玉米油的工艺条件进行了初步探讨。

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 广东省农业攻关计划 (2006B13001001) 资助

作者简介: 董恒涛 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物药物和生物技术

1 材料与方法

1.1 脂肪酶的来源

经紫外诱变处理过的粗状假丝酵母 Z6 产脂肪酶, 简称脂肪酶 A, 由本实验室提供;

由国内某酶制剂公司提供的脂肪酶, 简称脂肪酶 B。

1.2 培养基及其培养方法

固体斜面培养基: 葡萄糖 10 g/L, 酵母粉 2 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 2% 琼脂, pH 值自然, 1.01×10^5 Pa 下灭菌 20 min。

液体种子培养基: 葡萄糖 10 g/L, 酵母粉 2 g/L, 蛋白胨 10 g/L, pH 值自然, 1.01×10^5 Pa 下灭菌 20 min。

发酵液培养基 (%): 橄榄油 4, 蔗糖 0.5, 玉米浆 4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, 吐温-800.05, pH 5.0, 1.01×10^5 Pa 下灭菌 20 min。

将低温保存的经紫外诱变过的粗状假丝酵母 (*Candida valida*) 接种于斜面培养基, 28~30 °C 培养 48 h, 活化菌种 3 次, 接入液体种子培养基, 28~30 °C 摇床 140 r/min 培养, 后将种子液转入发酵液培养基中, 进行 28~30 °C 摇床 140 r/min 下发酵 48 h。

1.3 试剂与仪器

试剂：橄榄油，化学纯，江苏永华精细化学品有限公司出品；各种天然油脂均为市售；其他各种试剂均为分析纯。

仪器：电热恒温水浴锅（DZKW-S-4，北京市永光医疗仪器厂）、旋涡混合器（XW-80A，上海精科实业有限公司）、空气浴恒温摇床（金坛市富华仪器有限公司）等。

1.4 试验方法

1.4.1 底物乳化液的制备

量取聚乙烯醇（PVA）溶液 60.00 mL，加入橄榄油 20.00 mL，混合于烧杯中，用旋涡混合器乳化，转速 10000 r/min，3 min/次，乳化液在冰箱保存，每次使用时要重新乳化。

1.4.2 粗酶液制备方法

发酵结束后，取发酵液于离心管中，并将其置于超声波细胞破碎仪内冰盒，探头没入离心管液面下，设定破碎时间为 30 min，时间间隔 3 s，进行超声波破碎。

1.4.3 酸碱滴定法测定酶活

参见文献[6]

1.4.4 水解率的测定

1.4.4.1 试验方法

在 100 mL 的锥形瓶中加入 1 mL 植物油，精确称其质量 M，分别加入 5 mL pH 7.5 的磷酸缓冲溶液，再加入油量 2% 的吐温 80 作乳化剂，在恒温磁力搅拌器上室温乳化 10 min^[8]，再放入 45 °C 的空气浴恒温摇床中，转速 140 r/min，再加入为 5 mL 粗状假丝酵母发酵破碎液，恒温反应若干小时，测定样品的酸价。

1.4.4.2 分析方法

皂化价（SV）的测定：参见文献[7]；酸价（AV）的测定：参见文献[8]；水解率(%)=(AV-AV₀)/SV。

1.4.5 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，测定其酶催化反应初速度，再根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法求出该酶对底物的 K_m 值和最大的反应速率 V_{max}。

2 结果与分析

2.1 不同低级酯的水解

用不同碳链长度的酯代替橄榄油作为底物，按上述方法测定酶活，以橄榄油测得酶活为 100%，比较由两种不同脂肪酶对于不同碳链长度酯的相对水解能力，以相对酶活（%）表示，如表 1 所示。

表 1 脂肪酶对低级酯的水解

Table 1 Lipase-catalyzed hydrolysis of simple esters

酯类	脂肪酶A/%	脂肪酶B/%
酸乙酯	0	0
乙酸丁酯	44	0
乙酸乙烯酯	58	5
丙烯酸丁酯	69	10
正丁酸乙酯	94	36
橄榄油	100	100

不同来源的脂肪酶对底物的专一性是不同的，从表 1 可见，脂肪酶 A 和脂肪酶 B 对低级酯的作用相对缓慢，其水解能力与脂肪酸碳链长度有关，随着脂肪酸碳链长度的增加，使得水解能力也逐渐增加。脂肪酶 A 对低级酯的水解能力较好于脂肪酶 B。

2.2 脂肪酸甘油酯的水解

用不同甘油酯代替橄榄油作为脂肪酶的底物，配制成相同浓度的乳化液，在同样的条件下测定两种脂肪酶的酶活，以橄榄油测得酶活为 100%，结果见表 2。

表 2 脂肪酶对甘油酯的水解

Table 2 Lipase-catalyzed hydrolysis of fatty acid glycerides

项目	脂肪酶A/%	脂肪酶B/%
三乙酸甘油酯	25	16
正丁酸甘油酯	94	89
三油酸甘油酯	139	115
橄榄油	100	100

由表 2 可以看出，脂肪酶 A 和脂肪酶 B 对三油酸甘油酯都表现出较强的水解能力，而对三乙酸甘油酯的水解能力都比较弱，对正丁酸甘油酯的水解能力相差不多。这表明两种脂肪酶对不同的底物表现出不同的水解能力。同时还可知，脂肪酶 A 对脂肪酸甘油酯的水解作用较强于脂肪酶 B，可推测出脂肪酶来源不同，对不同底物的水解能力会有所不同。

2.3 各种天然油脂的水解特异性

脂肪酶是水解天然油脂的一类特殊酯键水解酶，因此研究中选用几种天然油脂做为底物，在同样条件下测定酶活，以橄榄油酶活为 100%，比较两种脂肪酶对不用底物的水解能力。

由表 3 的结果可知，脂肪酶 A 对花生油、猪油、茶油、月见草油和玉米油的水解能力要比脂肪酶 B 强，而脂肪酶 B 对大豆油的水解能力则比脂肪酶 A 强。脂肪酶 A 对天然油脂的水解能力大小依次为：茶油>月见草油>猪油>花生油>橄榄油>玉米油>大豆油。这可能与其脂肪酸组成和主要组分—油酸的含量有关。脂

脂肪酶B对天然油脂的水解能力大小依次为: 月见草油> 茶油>橄榄油和 大豆油>花生油>玉米油和猪油。

表3 脂肪酶对天然油脂的水解特异性

Table 3 Lipase-catalyzed hydrolysis of natural oils and lipids

项目	橄榄油/%	花生油/%	大豆油/%	玉米油/%	猪油/%	茶油/%	月见草油/%
脂肪酶 A	100	106.7	72.2	73.3	115.6	169.5	147.2
脂肪酶 B	100	87.5	100	62.5	62.5	105.3	110.5

2.4 粗状假丝酵母Z6产脂肪酶水解玉米油和大豆油的工艺探讨

脂肪酶水解油脂生成混合脂肪酸的反应在一个乳化体系中进行, 其水解率与体系的 pH 值、温度、反应时间、乳化剂等因素密切相关, 本试验利用本实验室经紫外诱变处理过的粗状假丝酵母 Z6 产脂肪酶分别水解玉米油和大豆油, 通过测定油脂的水解率大小, 从而探讨各个因素对油脂水解的影响。

2.4.1 pH值对水解率的影响

研究了不同 pH 值条件下, 假丝酵母 Z6 产脂肪酶催化玉米油和大豆油水解活性的变化。试验方法同 1.4.4.1, 反应介质是 pH 值分别为 6、7、7.5、8 和 8.5 的磷酸盐缓冲液。在 45 °C 的恒温摇床上, 恒温反应 8 h, 分别测定脂肪酶对两种底物的水解率, 结果如图 1 所示。

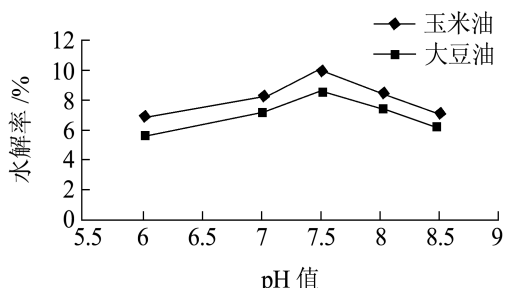


图1 pH 值对水解反应的影响

Fig.1 Effect of pH value on lipase-catalyzed hydrolysis of corn oil and soybean oil

反应体系的 pH 值可以影响酶的活性部位基团、底物及酶-底物复合物等的离子化状态, 因而对酶活力有着显著的影响。由图 1 可知, 该脂肪酶水解玉米油和大豆油的最佳 pH 值是 7.5, 但是 pH 值变化对油脂的水解率影响不大。可见此酶在中性 pH 值范围内有较强的适应性。

2.4.2 温度对水解率的影响

按照试验方法 1.4.4.1, 通过在 40 °C、42.5 °C、45 °C、47.5 °C 和 50 °C 的不同温度的恒温摇床上, 恒温反应 8 h, 得到反应温度与油脂水解率的关系如图 2。

由图 2 可以看出, 玉米油和大豆油的最佳水解温度为 45 °C。即脂肪酶在 45 °C 时达到最佳反应温度, 在相同时间内水解率最高。45 °C 以后酶的反应活性明

显降低, 在 50 °C 时失活严重。酶的最适合温度主要由所采用脂肪酶的种类来决定, 不同的脂肪酶有其最适的反应体系, 温度过高时, 导致酶分子中的氢键或疏水键破坏, 蛋白质活性中心的基本构象改变, 从而引起脂肪酶失活。同时, 这也与高温下酶的稳定性有关。

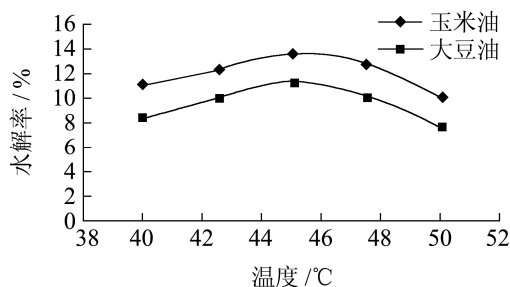


图2 温度对水解反应的影响

Fig.2 Effect of temperature on lipase-catalyzed hydrolysis of corn oil and soybean oil

2.4.3 时间对水解反应的影响

试验方法同 1.4.4.1, 在温度为 45 °C, pH 值为 7.5 的反应条件下, 分别测定不同反应时间下玉米油和大豆油的水解率, 得时间与水解率关系如图 3 所示。

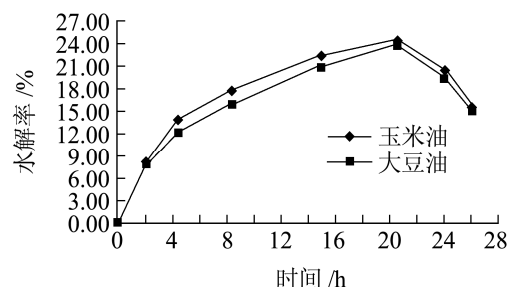


图3 时间对水解反应的影响

Fig.3 Effect of reaction time on lipase-catalyzed hydrolysis of corn oil and soybean oil

由图 3 可见, 随着水解时间的不断延长, 玉米油和大豆油的水解率也不断增加, 当达到 21 h 时水解率达最大, 再后来水解率明显降低。这是由于在反应初期, 反应速度较快, 水解率增加幅度较大, 但随着反应时间的延长, 反应速度逐渐降低, 水解率的增加趋于平缓, 当达到最大水解率后, 发生逆向反应的速度超过正向反应, 即酯化反应速率大于水解反应, 此时水解率表现为下降。因此, 最佳水解时间为 21 h。从图 3 中还可看出玉米油和大豆油的水解率不高, 这可

能与使用粗酶液催化水解反应有关。

2.4.4 多因素的正交实验

在油脂的酶法水解实验中，除了以上我们讨论过的 pH 值、温度、水解时间的影响之外，还有其它很多因素，例如：不同油水比、乳化剂浓度、脂肪酶活性促进剂的选择和用量等制约着油脂的水解，这里，我们选取反应体系中不同油水比、乳化剂浓度、Ca²⁺等作为影响因素，在酶促反应温度 42 °C、pH 7.5、时间 24 h 条件下，探讨对油脂水解率的影响，并找出最大的影响因素。

表 4 正交试验设计与结果

Table 4 Orthogonal design and the results

实验号	油水比	乳化剂浓度/%	Ca ²⁺ 浓度 (mmol/L)	玉米油水解率/%	大豆油水解率/%
1	1:10	2	5	18.83	15.54
2	1:10	4	30	20.14	16.85
3	1:10	6	75	20.63	17.67
4	1:4	2	30	15.07	13.09
5	1:4	4	75	17.69	15.71
6	1:4	6	5	14.57	12.92
7	1:2.5	2	75	16.37	14.56
8	1:2.5	4	5	14.41	12.76
9	1:2.5	6	30	15.07	13.58

玉米油					
K ₁	59.60	50.27	47.81		
K ₂	47.33	52.24	50.28		
K ₃	45.85	50.27	54.69		
R	13.75	1.97	6.88		

大豆油					
K ₁	50.06	43.19	41.22		
K ₂	41.72	45.32	43.52		
K ₃	40.90	44.17	47.94		
R	9.16	2.13	6.72		

由上述正交试验可以看出，油水比对水解反应的影响最大，其次为 Ca²⁺浓度，影响最小的是乳化剂的浓度。当反应体系中的油水比为 1/10，乳化剂相对于油的浓度为 4%，Ca²⁺浓度为 75 mmol/L 时，玉米油和大豆油都有最大的水解率。这与其它关于脂肪酶水解油脂的文献报道^[9,10]结果相同。

2.5 底物反应动力学参数的测定

为了研究紫外诱变后的粗状假丝酵母产脂肪酶对底物的催化特异性，对其反应动力学进行了研究。在

最适反应条件下，改变底物浓度，测定酶反应的初速度，以酶反应初速度对底物浓度作 Lineweaver-Burk 双倒数图，见图 4，求出该酶水解底物的 Km 值和最大的反应速率 Vmax。

Km 值的大小与酶的性质有关，Km 值越小表示酶和底物的亲和力越大。根据试验数据建立回归方程为 y=0.0011x+0.0898，计算得到紫外诱变后的粗状假丝酵母产脂肪酶水解反应的米氏常数 Km=12.25×10⁻³ mol/L 和最大反应速率 Vmax=11.14 μmol/min。与相关文献报道相比较^[11]，该酶对甘油三酯具有较高催化特异性。

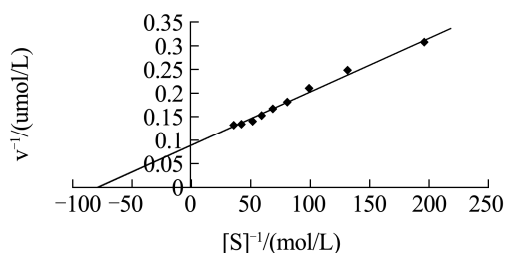


图 4 脂肪酸水解甘油三酯的 Lineweaver-Burk 图

Fig.4 Lineweaver-Burk plot of lipase-catalyzed hydrolysis of triglyceride

3 结论

通过研究比较两种不同来源的脂肪酶对低级酯类、脂肪酸甘油酯类和天然油脂发现，脂肪酶对不同底物的水解能力不同，两种脂肪酶对同一底物的水解能力也有很大的差异。推测这种差异不但与底物的分子结构或组成成分有关，而且与酶的结构、酶活性中心氨基酸的组成等有关。对其继续深入研究，必将推动脂肪酶的应用进程与范围。

脂肪酶催化油脂水解是在油/水乳化体系中进行，其反应与多种因素有密切的关系，当水解反应进行到一定程度时，会有逆反应发生，即发生酯化反应。通过实验，我们得出经紫外诱变后的粗状假丝酵母 Z6 产脂肪酶水解油脂（玉米油和大豆油）的较佳工艺参数为：pH 7.5，温度为 45 °C，水解反应时间为 21 h，油水比为 1/10，乳化剂相对于油的浓度为 4%，Ca²⁺浓度为 75 mmol/L 时，玉米油和大豆油都有较好的水解率。

经紫外诱变后的粗状假丝酵母 Z6 产脂肪酶水解反应的米氏常数 Km 为 12.25×10⁻³ mol/L、最大反应速率 Vmax 为 11.14 μmol/min。

(下转第721页)