

根霉 ZM-10 脂肪酶部分纯化及酶学性质研究

李燕¹, 连毅², 陈义伦³, 徐静^{1,*}

(1. 浙江省温州市农业科学研究院食品所, 浙江 温州 325006

2. 温州医学院第二附属医院, 浙江 温州 325035 3. 山东农业大学食品学院, 山东 泰安 271018)

摘要: 本实验室以合成己酸乙酯的转化率为指标, 从酒厂筛选到一株合成己酸乙酯活性较高的根霉 ZM-10, 本实验以该菌株为出发菌种, 将其脂肪酶进行部分纯化后, 研究了酶学性质。结果表明, 根霉脂肪酶的最适反应温度为 25℃; 在 20℃ 时具有较好的稳定性, 该酶在 30℃ 80min 后, 残活还有 31.9%; 脂肪酶在 pH7.0 和 8.0 有较好的稳定性; 2mmol/L 金属盐离子浓度时, Na⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、EDTA 对脂肪酶的活力有一定的促进作用, 在 5mmol/L 时, 除 Cu²⁺ 外, 其他金属离子均表现出不同程度的抑制作用; 表面活性剂 CTAB 和 Tween-80 对脂肪酶活性有一定的抑制作用, SDS 改善作用比较大; 在最适反应条件下的动力学常数 K_m 和 V_{max} 分别为 18.2mmol/L 和 625U/L。
关键词: 根霉; 脂肪酶; 己酸乙酯; 纯化; 酶学性质

Portial Purification and Properties of *Rhizopus* ZM-10 Lipase

LI Yan¹, LIAN Yi², CHEN Yi-lun³, XU Jing^{1,*}

(1. Institute of Food, Wenzhou Academy of Agricultural Sciences, Wenzhou 325006, China;

2. The Second Clinical Medical College, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China;

3. College of Food Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Using conversion rate of ethyl hexanoate as the index, a strain *Rhizopus* ZM-10 producing lipase was screened out from liquor factory. We studied properties of the *Rhizopus* lipase after partical purification. The optimum temperature of the lipase was 25℃, and was stable below 30℃. The lipase optimal pH was 7.0 and 8.0. When metal ion concentration was 2mmol/L, its activity was increased with amendment of Na⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, EDTA, and when metal ion concentration was 5mmol/L, all metal ion inhibited its activity in different degree except Cu²⁺. The concentration of surfactants affected lipase activity, and the type of surfactants had no significant effect of lipase activitiy. The values of K_m and V_{max} were 18.2mmol/L and 625U/L in optimum reaction conditions.

Key words: *Rhizopus* lipase; ethyl hexanoate; purification; properties

中图分类号: Q814.1; Q556.1

文献标识码 A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0314-04

脂肪酶(lipase E. C. 3. 1. 1. 3)是一类特殊的酯键水解酶, 它作为生物催化剂可催化由不同底物出发的水解和合成反应^[1]。近年来, 脂肪酶已广泛应用于洗涤剂、有机合成、食品、药品、化妆品等行业^[2], 特别是在风味酯行业的应用, 促进了脂肪酶研究的飞速发展^[3-4]。

己酸乙酯是浓香型曲酒的主要呈香物质, 其含量高低直接影响曲酒的香型和风格, 保持浓香型白酒中己酸乙酯的含量是浓香型白酒生产的一个关键技术^[5]。为了提高己酸乙酯的含量, 传统上通过人工老窖泥培养己酸菌的方法增加前体物己酸的含量, 从而有利于己酸乙酯的合成, 但是由于酯化反应速度慢, 大曲中酯化菌含量低, 造成了大曲酒生产发酵生香周期长, 优质酒率

低^[6]。而在酒醅中加入脂肪酶来催化合成己酸乙酯, 可以缩短发酵周期, 提高酒体中己酸乙酯的含量。

本实验以合成己酸乙酯的转化率为指标, 从白酒厂筛选到一株合成己酸乙酯活性较高的根霉, 进行部分纯化后, 具体研究其酶学性质, 以期以该菌株用于白酒工业化生产提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 菌种与amp;试剂

根霉 ZM-10, 本实验室选育保存菌种。

收稿日期: 2007-03-13

作者简介: 李燕(1981-), 女, 硕士, 研究方向为食品发酵及营养。E-mail: liyan1012@163.com

*通讯作者: 徐静(1964-), 女, 高级农艺师, 本科, 研究方向为食品科学。E-mail: xujwz@yahoo.com.cn

1.1.2 仪器与设备

DEAE-Sephacrose Fast Flow Amresco公司; PEG10000 Pharmacia Biotech公司; 脂肪酶试剂盒 南京建成生物工程研究所。

HH-B11-500电热恒温培养箱 上海市跃进医疗器械一厂; SW-CJ-1F超净工作台 苏州安泰空气技术有限公司; ZD-85A 气浴恒温振荡器 常州澳华仪器有限公司; YXQG02 电热式蒸汽消毒器 山东新华医疗器械厂; DELTA320pH计 梅特勒-托利多仪器有限公司; 层析柱 上海华美实验仪器厂; ALPHAI-5 真空冷冻干燥仪 德国Christ公司; WFZUV2000紫外可见分光光度计 尤尼柯仪器有限公司; Allegra 64R型高速冷冻离心机 Beckman公司。

1.2 脂肪酶的制备

菌种在麸皮汁蔗糖斜面培养基培养3d, 用无菌水洗下孢子, 稀释孢子悬浮液到每毫升含 $10^5 \sim 10^6$ 个孢子。1ml孢子悬浮液接到50ml发酵培养基中(250ml三角瓶), 在30℃培养箱中培养72h。

取出上层菌丝体, 用去离子水洗去发酵残留物, 冰冻后在真空冷冻干燥机中冻干。在冰浴中用研钵将菌丝体磨成粉状, 4℃冰箱中保存。

1.3 脂肪酶活力测定方法

将甘油三酯底物缓冲液在37℃水浴中保温5min以上, 往试管中加入0.05ml酶液, 再用5ml加样器吸取4ml预温的底物缓冲液冲入试管中, 迅速用保鲜膜盖住管口, 立即颠倒混合5次, 倒入比色皿中, 在420nm处, 读取吸光度(A₁)。再将此比色液倒入原试管中置37℃水浴中保温10min, 再用上法读取吸光度(A₂)。做三次重复实验。

在37℃条件下, 每升酶液在反应体系中与底物反应1min, 每消耗1μmol底物为一个酶活力单位。A_s为标准管浓度的吸光度。

$$\text{脂肪酶活力} = \frac{A_1 - A_2}{A_s} \times 3632$$

1.4 蛋白浓度测定方法

采用考马斯亮兰法。

1.5 脂肪酶的分离纯化

取8g脂肪酶粉, 0.02mol/L pH7.0的缓冲液中4℃浸提12h, 6000r/min冷冻离心20min, 收集上清液。向提取液中加入固体硫酸铵分级沉淀, 收集30%~60%饱和度的沉淀, 溶于少量缓冲液中, 透析除盐后得粗酶液(I)。将透析液上样到已用上述缓冲液预平衡的DEAE-Sephacrose Fast Flow(1.6cm × 20cm)上, 以含NaCl的同一缓冲液进行梯度洗脱, 流速为20ml/h, 收集活性组

分(II), 用PEG-10000浓缩后进行酶学性质测定。

1.6 酶学性质研究

1.6.1 温度对脂肪酶活力的影响

将反应体系分别置于10、15、20、25、30、35、40、45和50℃的水浴中进行反应, 测定脂肪酶活力, 确定最适反应温度。

1.6.2 脂肪酶的温度稳定性

取同样浓度的脂肪酶分别置于20、25和30℃的水浴中, 每隔20min取样测定残余酶, 用未经处理的酶液作对照(为100%), 共测定80min。

1.6.3 脂肪酶的pH稳定性

将酶液分别与一定量的缓冲液(pH6~9)混合, 置于4℃放置10h, 取出后在最适温度下测定残余酶活力。

1.6.4 金属离子对脂肪酶活性的影响

在测酶活的反应体系中, 分别加入终浓度为2mmol/L和5mmol/L的金属盐离子, 阴离子均为氯离子, 混合后放置10min, 测定不同离子对脂肪酶活力的影响。

1.6.5 表面活性剂对脂肪酶活性的影响

用CTAB、SDS、Tween-80和Triton-100四种表面活性剂按0.05%、0.1%和0.2%的量加入反应体系。混合后放置10min, 测定不同表面活性剂对脂肪酶活力的影响。

1.6.6 脂肪酶K_m值的测定

在pH7.0、温度25℃的条件下, 分别将底物浓度稀释到0~40mmol/L, 测定脂肪酶在不同底物浓度下的酶活。根据Lineweaver-Burk方程, 求此条件下K_m值和V_{max}。

2 结果与分析

2.1 脂肪酶的纯化

经硫酸铵分级沉淀和DEAE-Sephacrose FF柱层析纯化后, 脂肪酶蛋白纯化了7.06倍, 回收率为30.32%, 比活为29.58。

表1 酶的纯化步骤
Table 1 Summary of purification procedure

纯化步骤	总蛋白 (mg)	总酶活 (U)	酶比活 (U/mg)	纯化倍数	回收率 (%)
发酵液	2670.0	11200.0	4.19	1.00	100
硫酸铵沉淀	943.53	7586.0	8.04	1.92	69.92
DEAE-Sephacrose FF柱层析	114.80	3395.84	29.58	7.06	30.32

2.2 脂肪酶的最适反应温度

图1表明, 脂肪酶在15~35℃都保持一定的活力(相

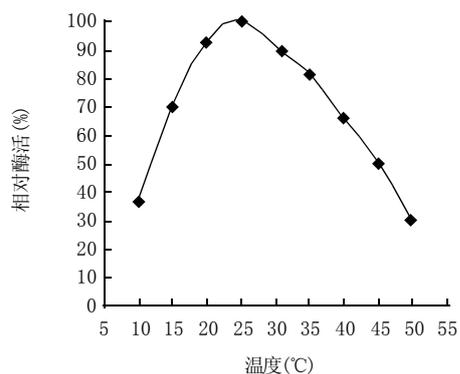


图1 温度对脂肪酶活力的影响
Fig.1 Effects of temperature on activity of lipase

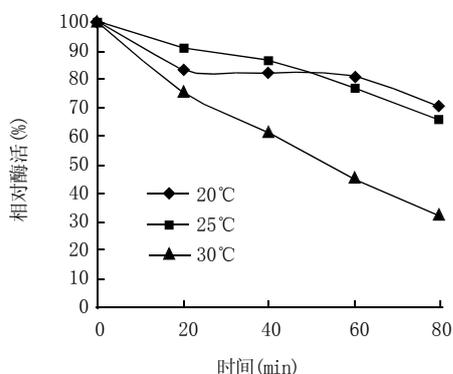


图2 脂肪酶的温度稳定性
Fig.2 Heat stability of lipase

对酶活70%以上), 其最适反应温度为25℃, 和酒精主

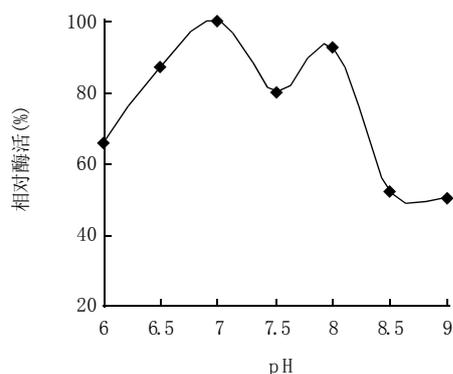


图3 脂肪酶的pH稳定性
Fig.3 pH stability of lipase

发酵期的温度接近(26~27℃), 即酒精的发酵温度适于脂肪酶合成己酸乙酯。

2.3 脂肪酶的温度稳定性

测定脂肪酶在不同温度的稳定性, 结果见图2。该酶在20℃时具有较好的稳定性, 60min还有82.4%的残余酶活; 该酶在30℃ 80min后, 残活还有31.9%, 说明该酶在30℃以下是稳定的。

2.4 脂肪酶的pH稳定性

由图3可知, 该酶在pH6~9范围内有良好的稳定性, 脂肪酶的最适pH在7.0和8.0时有两个峰, 表明酶液中可能存在同工酶。有很多研究表明, 在一些微生物中发现脂肪酶同工酶, Baillargeon^[8]报道在*Geotrichum candidum*商品脂肪酶中含有各种不同相对分子量、等电点和专一性的同工酶; 郭敏辰等从碱性脂肪酶PG37中分离到3种同工酶^[9]。

2.5 金属离子对脂肪酶活性的影响

由表2知, 在2mmol/L金属盐离子浓度时, Na⁺、Cu²⁺、Fe³⁺、EDTA对脂肪酶的活力有一定的促进作用; K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺对脂肪酶的活力影响不大; Mn²⁺对脂肪酶的活力有明显的抑制作用。在5mmol/L金属盐离子浓度时, 除Cu²⁺外, 其他金属离子均表现出不同程度的抑制作用, 这可能是金属离子浓度高, 对酶活性起抑制作用。

表2 金属离子对脂肪酶活力的影响
Table 2 Effects of metal ion on activity of lipase

金属离子	2mmol/L金属离子		5mmol/L金属离子	
	酶活(U/L)	相对酶活(%)	酶活(U/L)	相对酶活(%)
对照	673.17	100	673.15	100
Na ⁺	814.07	120.93	635.59	94.42
K ⁺	657.52	97.67	613.17	91.09
Ca ²⁺	641.53	95.30	598.36	88.89
Mg ²⁺	620.73	92.21	576.22	85.60
Fe ³⁺	965.33	143.4	523.58	77.78
Cu ²⁺	901.71	133.95	696.04	103.4
Mn ²⁺	234.83	34.88	135.98	20.2
EDTA	761.02	113.05	761.00	93.94

2.6 表面活性剂对脂肪酶活性的影响

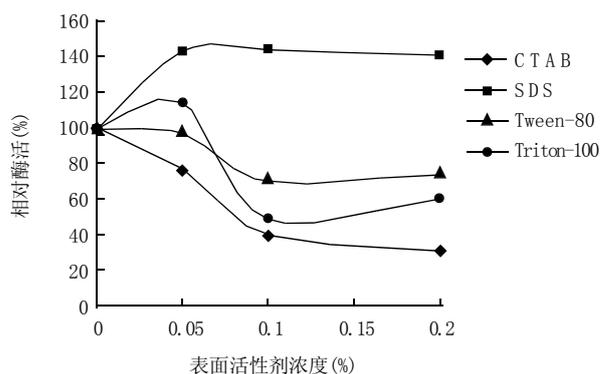


图4 表面活性剂对脂肪酶活力的影响
Fig.4 Effects of surfactants on activity of lipase

这四种表面活性剂对脂肪酶的催化能力都有不同程度的影响, 阳离子型表面活性剂CTAB和非离子型表面活性剂Tween-80对脂肪酶活性有一定的抑制作用; 阴离子型表面活性剂SDS对脂肪酶的催化活性改善作用比较大; 非离子型表面活性剂Triton-100, 则因浓度的不

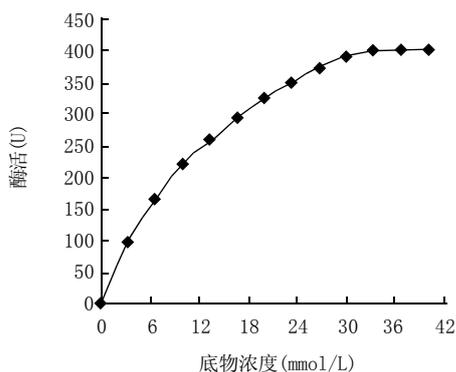


图5 底物浓度与酶活的关系

Fig.5 Relationship between concentration of substrate and activity of lipase

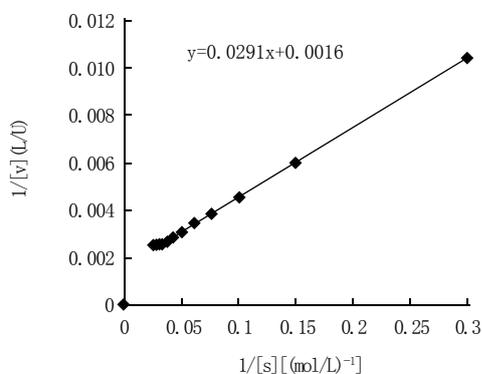


图6 米氏常数(K_m)的测定

Fig.6 Assay of Michaelis constant

同，对脂肪酶活性的作用不同。由上可见，表面活性剂对脂肪酶的影响与其自身的类型关系不大，这和徐岩等^[10]的研究结果一致。

由图5可知，影响表面活性剂改善酶催化活性，除了其种类外，还有其加入的质量浓度。总的来说，随

着质量浓度的提高，表面活性剂会由改善作用转为抑制，或抑制作用增大。

2.7 底物浓度对脂肪酶活性的影响

由图5可知，在底物浓度小于12mmol/L范围内，脂肪酶活性与底物浓度成线性关系；底物浓度继续增加，脂肪酶的活性增加开始变得缓慢。这是由于随着底物浓度的增加，溶液中的酶逐渐与底物结合，待酶分子全部被底物饱和后，酶活达到最大值，不再改变。

根据 Lineweaver-Burk 方程 $1/V = (1/[S])K_m/V_{max} + 1/V_{max}$ ，以 $1/V$ 为纵坐标， $1/[S]$ 为横坐标作图(图6)。求得此条件下 $K_m = 18.2 \text{ mmol/L}$ ， $V_{max} = 625 \text{ U/L}$ 。

参考文献：

- [1] 李春香, 甄宗园. 脂肪酶特性及其应用[J]. 粮食与油脂, 2003(3): 19.
- [2] JAEGER K E, EGGERT T. Lipase for biotechnology[J]. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13: 390-397.
- [3] 徐岩, 章克昌, 王亚非. 微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究[J]. 生物工程学报, 1998, 14(2): 214-217.
- [4] KRISHNA S H, PRAPULLA S G, KARANTH N G. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate using immobilized *Rhizomucor miehei* lipase in non-aqueous media[J]. Journal of Industry Microbiology & Biotechnology, 2000, 25: 147-154.
- [5] 唐瑞. 己酸菌、窖泥与浓香型白酒之间的关系[J]. 酿酒, 2005, 32(4): 24-26.
- [6] 戴群, 赵光鳌, 王宁波. 己酸菌发酵条件研究[J]. 南京师范大学学报, 2005, 5(3): 76-79.
- [7] 高修功, 曹淑桂. 脂肪酶活性和选择性受溶剂不同物化参数控制[J]. 生物化学与生物物理学报, 1997, 29(4): 337-342.
- [8] BAILLARGEON M W. Purification and specificity of lipase from *Geotrichum candidum*[J]. Lipids, 1990, 25: 841-848.
- [9] 邹敏辰, 黄伟达, 孙崇荣, 等. 碱性脂肪酶同工酶的分离纯化[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(1): 9-11.
- [10] 徐岩, 章克昌. 有机相酶促反应中固定脂肪酶的非共价修饰[J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(4): 16-19.