

嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶活力测定的研究

曹 健, 王月囡, 王红军, 王育军, 于海东

(河南工业大学生物工程学院 河南 郑州 450052)

摘 要: 亚油酸异构酶能催化亚油酸转化为具有生理活性的共轭亚油酸。有关该酶活力的测定方法在国内外不同的文献中差别较大, 尚没有统一的方法。本文对嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶活力的测定方法进行了研究, 以期为该酶分离纯化过程中酶活力的测定提供参考。通过单因素试验和正交试验, 确定了该酶的最佳酶反应条件为: 粗酶液添加量 0.10ml, 亚油酸 0.70ml, Tween-80 2.00ml, 反应温度 37℃, 反应时间 3h。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 亚油酸异构酶; 酶活力测定

Research on Enzyme Activity Assay of *Lactobacillus acidophilus* Linoleate Isomerase

CAO Jian, WANG Yue-nan, WANG Hong-jun, WANG Yu-jun, YU Hai-dong

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: Linoleate isomerase can catalyze the chemical reaction from linoleic acid to conjugated linoleic acid, while the latter shows many physiological activities. However, linoleate isomerase activity assay differs from literature to literature. Enzyme activity assay of linoleate isomerase of *Lactobacillus acidophilus* was studied in this paper, so as to provide some reference to study the enzyme activity during the process of enzyme purification. Optimum reaction conditions for linoleate isomerase activity were determined by single-factor test and orthogonal test, as follows: crude enzyme 0.10ml, linoleic acid 0.70ml, Tween-80 2.00ml, reaction temperature 37℃, and reaction time 3h.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; linoleate isomerase; enzyme activity mensuration

中图分类号: Q558.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0155-04

共轭亚油酸(Conjugated Linoleic Acid, CLA)是亚油酸(Linoleic Acid, LA)衍生的共轭双烯酸的多种位置和几何异构体的总称。在各种共轭亚油酸立体异构体中, c9, t11-18:2和t10, c12-18:2两种异构体被认为最具有生物活性, 如抗癌、抗动脉粥样硬化和促进细胞分裂、阻止肌肉退化、延缓机体免疫力衰退等^[1], 而且c9, t11-18:2是惟一能被动物细胞吸收进入磷脂层的异构体^[2]。目前, 工业化生产CLA主要通过化学法如碱异构化法, 然而, 化学合成法的产物是十几种CLA异构体的混合物, 要将其中的活性异构体分离出来不仅成本高, 难度也很大, 尤其是其中的t, t异构体无益于健康, 在合成中还应尽可能避免生成。而利用某些微生物中的亚油酸异构酶却能专一性地获得活性异构体, 因此许多科学家开始致力于生物合成CLA的研究, 而亚油酸异构酶的研究是CLA生物合成深入研究的必然发展。

在亚油酸异构酶的研究中, 往往需要对酶活力进行测定。从各种文献中来看, 测定亚油酸异构酶活力时

的反应体系不尽相同, 所使用的底物也很多。目前, 还没有一种较为统一的测定方法。本文在对各种反应体系进行分析的基础上, 对该酶活力的测定方法进行了研究, 旨在确定一种较为快速、便捷、准确的亚油酸异构酶活力测定方法, 为相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种

嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) 1.1854中科院微生物所; 共轭亚油酸标准品 Sigma 公司; 亚油酸本实验室由红花油自制^[3], 经气相色谱检测, 纯度在99.6%以上; 酪蛋白, 北京双旋微生物培养基制品厂; 其它试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Bi ofuge台式高速冷冻离心机 德国Heraeus公司;
UV-2450紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; FA
25型实验室高剪切分散乳化机 上海弗鲁克机电设备有

收稿日期: 2005-11-09

基金项目: 河南省杰出青年科学基金资助项目(04120001800); 河南省高校杰出科研人才创新工程项目(2006KYCX008);

河南省教育厅高等学校创新人才培养工程资助项目

作者简介: 曹健(1969-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品微生物学。

限公司;JY92-II超声波细胞破碎仪 上海新芝生物技术研究
所;RE52A型真空旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 种子培养方法

将冰箱保藏的菌种转接到MRS斜面培养基上,37℃培养24h后,接入MRS培养基(121℃灭菌20min)内,37℃培养24h。

1.3.2 产酶诱导培养

每500ml三角瓶中装入300ml MRS液体培养基,加入30ml的亚油酸乳浊液(亚油酸:Tween80:水=0.5:1.0:98.5,V/V/V),121℃灭菌20min后,接入10ml种子液(每ml含菌体 5×10^8 个),37℃培养24h。培养好的菌液4℃、6000r/min离心10min,弃上清,加入100ml的磷酸盐缓冲液(pH5.0),均质10min后,4℃、6000r/min离心10min,弃去上清,即得含酶菌体。

1.3.3 粗酶液的制备

在所得含酶菌体中加入3~5倍的磷酸盐缓冲液(pH5.0),均质10min后,在冰浴中进行间歇破碎(破碎3s,间歇10s),4℃、12000r/min离心20~30min后,收集上清液,即为粗酶液。

1.3.4 共轭亚油酸的检测^[4]

共轭亚油酸在233~234nm之间有特殊吸收峰,而亚油酸却没有。利用紫外分光光度计在200~400nm波长范围内对共轭亚油酸标准品进行扫描,结果在233nm处有最大吸收峰。精确称量100mg共轭亚油酸标准品溶于环己烷中,配制成100mg/100ml溶液,梯度稀释后,以环己烷为参比在233nm处分别测定其吸光值,以共轭亚油酸浓度(X)为横坐标,吸光值(A)为纵坐标绘制出标准曲线,其回归方程为 $A=10.022X$, $R^2=0.9998$,为高度显著。根据此标准曲线,采用分光光度法,即可测定出样品中共轭亚油酸的含量。

1.3.5 共轭亚油酸酶活力的测定

在50ml三角瓶中加入一定量的粗酶液、亚油酸和Tween-80,于一定的温度下缓慢振摇,反应一定时间后加入10ml环己烷,210r/min振摇1h萃取油脂;15℃、10000r/min离心20min,取环己烷层,用微量进样器取10μl于装有10ml环己烷的刻度试管中,用分光光度计测定233nm处的吸光值,再对照标准曲线求得共轭亚油酸的含量。一个亚油酸异构酶活力单位U定义为:在上述酶活力测定方法下,1s内生成1μg CLA所需的酶量。

$$\text{酶活力(U/ml)} = (K \times G) / (V \times T)$$

式中:K为酶液稀释倍数,G为所生成的共轭亚油酸量(μg),V为吸取酶液体积(ml),T为保温时间(s)。

2 结果与分析

2.1 反应体系中粗酶液量对酶活力的影响

在50ml三角瓶中加入0.50ml亚油酸和1.00ml Tween-80,并分别加入不同体积的粗酶液,37℃反应3h,酶活力与粗酶液添加量的关系见图1。

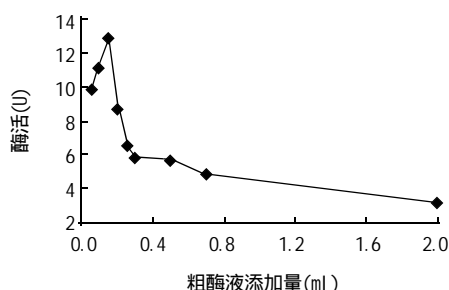


图1 粗酶液添加量对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.1 Influence of crude enzyme level on enzyme activity

在图1中,亚油酸酶活力先随粗酶液添加量的增加而升高,之后又下降,当粗酶液添加量为0.15ml时酶活力最高。这是由于酶与底物间的反应有一个最适量,酶量少时,底物相对过量,因而酶活力随粗酶液添加量的增加而升高,随着酶液量的继续增加,底物的相对含量逐渐减少,酶量超过最适量后,底物将不足以与所有的酶结合,因此酶活力不再升高。另一方面,酶液量增加的同时还导致反应体系体积增大,使底物浓度进一步下降;由于所用的是粗酶液,酶量增加的同时也向反应体系中带入更多的杂质,因此酶活力在达到最大值后并没有维持不变,而是随着酶液添加量的增加而下降。

2.2 亚油酸的添加量对酶活力的影响

在50ml三角瓶中加入0.05ml粗酶液和1.00ml Tween-80,并分别加入不同体积的亚油酸,37℃反应3h,酶活力与亚油酸添加量的关系见图2。

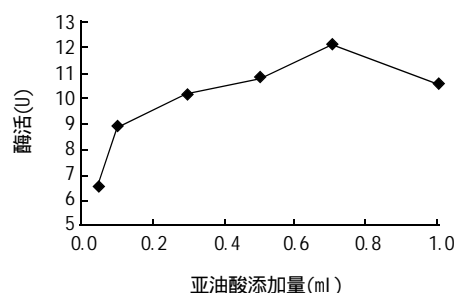


图2 亚油酸添加量对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.2 Influence of linoleic acid level on enzyme activity

与图1类似,在图2中,亚油酸异构酶活力先随亚油酸添加量的增加而升高,之后又有所下降,当亚油酸添加量为0.70ml时酶活力最高。其原因同样是由于酶与底物间的反应有一个最适量,而酶活力超过最大值后活力下降的原因,可能是由于反应体系体积增大所致。

2.3 Tween-80 的添加量对酶活力的影响

在50ml 三角瓶中加入0.05ml 粗酶液和0.70ml 亚油酸, 并分别加入不同体积的 Tween-80, 37℃ 反应 3h, 酶活力与 Tween-80 添加量的关系见图 3。

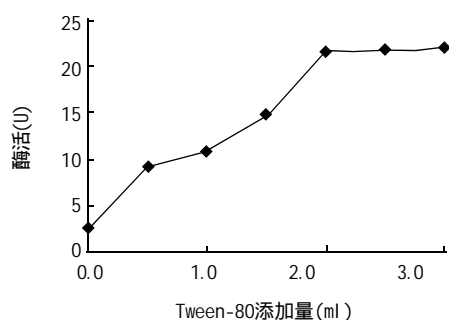


图3 Tween-80 添加量对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.3 Influence of Tween-80 level on enzyme activity

在图 3 中, 亚油酸异构酶活力先随 Tween-80 添加量的增加而升高, 当添加量达到 2.0ml 时酶活力达到最高值, 之后趋于稳定。Tween-80 是一种乳化剂, 在反应体系中添加 Tween-80 的目的是为了使亚油酸更好地分散到反应体系中, 从而与酶充分接触而发生反应。因此, 随着 Tween-80 添加量的增加, 所测酶活力逐渐升高, 不过, 由于反应体系中酶与底物的量是一定的, 酶活力达到最大值后继续增加 Tween-80 的量, 水相中酶与底物的相对浓度并未改变, 酶活力也不再变化。

2.4 反应温度对酶活力的影响

在 50ml 三角瓶中加入 0.05ml 粗酶液、0.50ml 亚油酸和 1.00ml Tween-80, 分别在不同的温度下反应 3h, 酶活力与反应温度的关系见图 4。

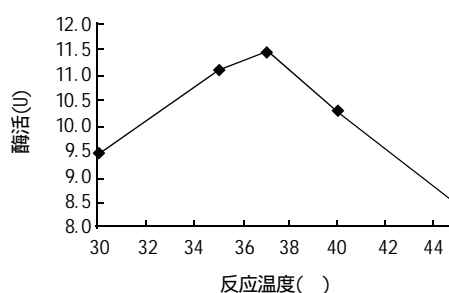


图4 反应温度对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.4 Influence of reacting temperature on enzyme activity

从图 4 可以看出, 和其他酶促反应一样, 亚油酸异构酶活力先随反应温度的升高而升高, 在 37℃ 时达到最大值, 说明在本实验条件下, 亚油酸异构酶的最适反应温度在 37℃ 附近; 之后继续升高反应温度, 由于高温对酶蛋白产生不利影响, 致使酶活力下降。

2.5 反应时间对酶活力的影响

在 50ml 三角瓶中加入 0.05ml 粗酶液、0.50ml 亚油酸和 1.00ml Tween-80, 分别在 37℃ 下反应不同的时间, 酶活力与反应时间的关系见图 5。

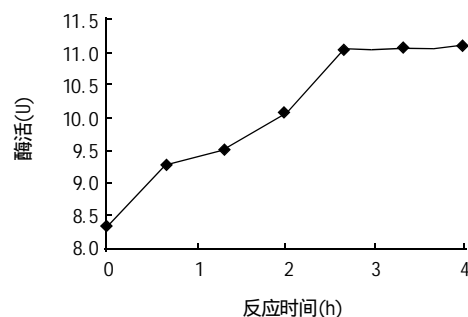


图5 反应时间对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.5 Influence of reacting time on enzyme activity

从图 5 可知, 在 1h 以内, 亚油酸异构酶活力随着反应时间的延长而迅速升高, 但反应时间超过 2h 后, 酶活力随反应时间的延长而增加的趋势变缓。这是由于反应体系中底物和酶的量是一定的, 因此, 在一定的时间范围内, 酶和底物间的反应将随反应时间的延长而更加彻底、完全, 表现为酶活力随反应时间的延长而增加; 当酶和底物的反应基本达到平衡后, 继续延长反应时间, 产物的量不再继续增加, 所测酶活力的变化也将趋于稳定。

2.6 缓冲液的添加量对酶活力的影响

在 50ml 三角瓶中加入 0.05ml 粗酶液、0.50ml 亚油酸和 1.00ml Tween-80, 再分别加入不同体积的磷酸盐缓冲液 (pH5.0), 37℃ 下反应 3h, 酶活力与缓冲液添加量的关系见图 6。

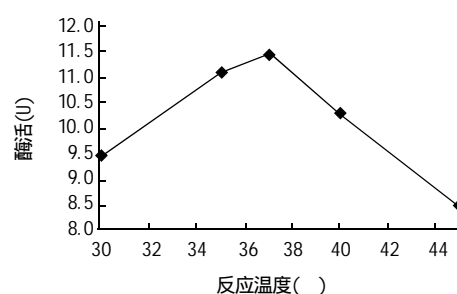


图6 缓冲液添加量对亚油酸异构酶活力的影响

Fig.6 Influence of buffer level on enzyme activity

在图 6 中, 亚油酸异构酶活力随着缓冲液添加量的增加而不断下降。这可能是由于随着缓冲液体积的增加, 导致反应体系中酶和底物的浓度逐渐减小, 从而使酶活力持续下降。

2.7 正交试验

根据以上各个单因素试验结果, 确定以亚油酸添加

表2 亚油酸异构酶活力测定方法的正交试验结果 $L_{27}(3^{13})$
Table 2 Orthogonal test results of enzyme activity mensuration of linoleate isomerase $L_{27}(3^{13})$

试验号	A	B	(A × B) ₁	(A × B) ₂	C	(A × C) ₁	(A × C) ₂	(B × C) ₁	(B × C) ₂	空白	酶活(U)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5.81
2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	12.43
3	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	6.27
4	1	2	2	2	1	1	1	2	3	3	3.29
5	1	2	2	2	2	2	2	3	1	1	12.29
6	1	2	2	2	3	3	3	1	2	2	16.76
7	1	3	3	3	1	1	1	3	2	2	1.49
8	1	3	3	3	2	2	2	1	3	3	12.25
9	1	3	3	3	3	3	3	2	1	1	21.55
10	2	1	2	3	1	2	3	1	1	3	8.03
11	2	1	2	3	2	3	1	2	2	1	14.51
12	2	1	2	3	3	1	2	3	3	2	18.85
13	2	2	3	1	1	2	3	2	3	2	10.58
14	2	2	3	1	2	3	1	3	1	3	15.99
15	2	2	3	1	3	1	2	1	2	1	20.83
16	2	3	1	2	1	2	3	3	2	1	2.86
17	2	3	1	2	2	3	1	1	3	2	16.91
18	2	3	1	2	3	1	2	2	1	3	18.16
19	3	1	3	1	1	3	2	1	1	2	8.51
20	3	1	3	2	2	1	3	2	2	3	16.83
21	3	1	3	3	3	2	1	3	3	1	19.01
22	3	2	1	1	1	3	2	2	3	1	10.91
23	3	2	1	2	2	1	3	3	1	2	16.81
24	3	2	1	3	3	2	1	1	2	3	13.18
25	3	3	2	1	1	3	2	3	2	3	7.54
26	3	3	2	2	2	1	3	1	3	1	14.04
27	3	3	2	3	3	2	1	2	1	2	18.84
	91.20	110.37	103.42	98.98	59.17	116.20	109.17	115.46	126.11	121.94	$A_1B_3C_3$ (通
	126.76	120.65	114.17	117.96	131.11	108.43	120.74	127.13	106.48	121.20	过直观观察) ;
	125.65	112.68	126.02	126.67	153.43	118.98	113.70	101.11	111.11	100.56	$A_2B_2C_3$ (通过
R	58.33	11.67	21.67	7.50	83.33	6.67	7.50	18.33	20.00	9.54	极差分析法)

表1 影响亚油酸异构酶促反应的因素水平表
Table1 Factors and levels in orthogonal test influencing enzymatic reaction of linoleate isomerase

水平	因 素		
	A 亚油酸(ml)	B 粗酶液(ml)	C Tween-80(ml)
1	0.10	0.05	0.50
2	0.70	0.10	1.00
3	1.00	0.15	2.00

量(A)、粗酶液添加量(B)、Tween-80 添加量(C)作为影响亚油酸异构酶活力的主要因素，各因素水平见表1，同时考虑三因素间的交互作用，采用13因素3水平的正交表 $L_{27}(3^{13})$ 进行了正交试验，结果见表2。试验中反应温度取37℃，反应时间为3h，不添加缓冲液。

由表2可知，各因素对亚油酸异构酶活力的影响的顺序为： $C > A > B \times C > A \times B > A \times C > B$ 。通

过直观观察得到的最佳组合是 $A_1B_3C_3$ ，即粗酶液添加量0.10ml，亚油酸添加量0.70ml，Tween-80添加量2.00ml，在此条件下所测亚油酸异构酶的活力为20.83U；通过极差分析法得到的最佳组合为 $A_2B_2C_3$ 。

参考文献：

[1] COOK M E, PARK Y, MILLER M W, et al. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune induced growth depression[J]. Poultry Science, 1993, 72: 1301-1305.
[2] SINGH M, THOMPSON H J, SCIMECA J A. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative[J]. Cancer Res, 1994, 54: 1212-1215.
[3] 曹健, 刘传云, 白爱英, 等. 一种从红花油中制备高纯度亚油酸的方法[J]. 食品科学, 2004, 25(6): 122-124.
[4] 张龙翔, 张庭芳, 孔令媛. 生化实验技术和方法[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.