

假单胞菌脂肪酶非水相催化性质

高修功 章克昌

(无锡轻工大学生物工程学院, 无锡 214036)

曹淑桂

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

摘要 以 酸与 醇的酯化为模型反应, 研究了假单胞菌脂肪酶的非水相催化性质。有机相中酶的催化作用需要一定的水分, 最适水含量因溶剂的不同而有所差异。通常, 极性强的溶剂其最适水含量高; 当以水活度衡量时, 各溶剂间的差别消失, 最适水活度均在 0.5 ~ 0.6 之间。有机溶剂中酶的热稳定性较水溶液中明显提高, 在环己烷中 80℃保温 6 h 酶活力仍保留约 80%; 连续使用 5 次, 酶活损失不到 10%。在环己烷中酶的最适作用温度为 50℃, 比水溶液中略高; 最适作用 pH 为 9.0, 与水溶液中相近。

关键词 脂肪酶; 假单胞菌; 非水相; 催化性质

中图分类号 TQ 925. 6

0 前 言

近年来, 非水相酶催化得到了广泛而深入的研究。由于脂肪酶稳定性好, 不需要辅因子, 其催化机理已经了解得比较清楚, 并且实现了商品化, 因此使脂肪酶成为有机相酶催化中应用最广泛的酶种之一^[1]。

对于脂肪酶在非水介质中的应用, 除了其水相的基本酶学性质以外, 它在有机溶剂中的最适作用条件、热稳定性等非水相基本性质更重要。作者曾对自己筛得的假单胞菌菌株所产的适于非水相催化用脂肪酶的水相基本性质作过报道^[2], 本文中以丁酸和丁醇的酯化为模型反应, 对该酶在非水相中的催化性质作了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 脂肪酶 由假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*) H18 菌株发酵制备^[2]。

1.1.2 试剂 各种试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 有机相酶催化反应 在盛有 10 ml 溶剂的具塞有刻度试管中加入丁酸和丁醇, 使两

者的浓度均为 0.4 mol/L (底物与溶剂均预先用 4A 分子筛除水), 然后加入 50 mg 酶和适量的水分, 密闭后在 37°C 恒温水浴中振荡 (150 r/min) 反应, 定时取样测定。

1.2.2 脂肪酶酯合成活力测定 将过滤除酶的反应样品 $100 \mu\text{l}$ 加入 5 ml 苯-甲醇混合溶剂 (两组分体积配比 $4:1$) 中, 用 25 mmol/L 氢氧化钠甲醇溶液滴定样品中未反应的有机酸, 以 3 g/L 百里酚蓝甲醇溶液为指示剂, 终点颜色由黄色变为蓝绿色^[3]。根据有机酸的减少量, 计算反应初速度。

1.2.3 有机相酶的热稳定性 将冻干酶粉置于有机溶剂中, 在特定温度 (甘油浴) 下保温一定时间, 然后迅速冷至室温, 减压蒸馏除去溶剂至酶粉完全干燥, 测定水解活力^[4]。

1.2.4 有机相酶的操作稳定性 反应 2 h 后, 过滤收集酶粉, 用相应的溶剂洗涤 $2\sim 3$ 次, 重新悬浮于反应体系进行下一轮反应, 测定每一次的反应初速度。

1.2.5 具有一定 pH 值状态的酶粉的制备 将酶粉溶于适量的具有某一 pH 值的 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液中, 冷冻干燥即得。

2 结果与讨论

2.1 水对有机相酶催化活力的影响

分别以苯 ($\lg P = 2.0$)、甲苯 ($\lg P = 2.5$)、四氯甲烷 ($\lg P = 3.0$) 和己烷 ($\lg P = 3.5$) 为溶剂, 研究体系水含量对该酶有机相催化活力的影响, 结果见图 1。绝对无水时酶无活性, 向体系中加入少量水就会激活酶, 说明酶必须有少量水才会显示活性。在一定范围内酶活力随着水分的增加而增大, 超出一定范围后水分增加酶活力反而下降。不同溶剂中酶的最大活力不同, 且达到最大活力的最佳含水量也不同。最佳含水量以己烷、四氯甲烷、甲苯

苯的顺序递增, 恰好与 4 种溶剂 $\lg P$ 的递增顺序相反。

原因可能是加入的水在主体溶剂与酶之间发生分配, 由于水较易分配在 $\lg P$ 较低的溶剂中, 相同体系含水量下分配给酶的水分就相对较少, 因而为达到最大酶活力所需的体系含水量

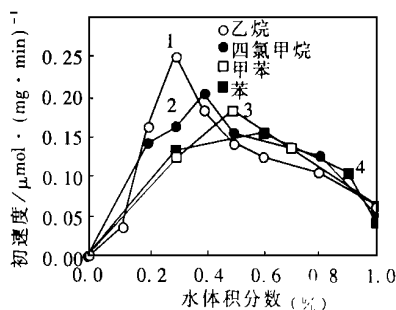


图 1 不同溶剂中水含量对脂肪酶酯合成活力的影响

1- 己烷; 2- 四氯甲烷; 3- 甲苯; 4- 苯

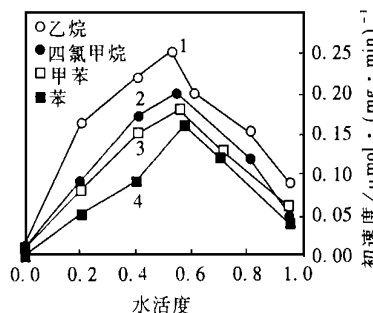


图 2 不同溶剂中水活度对脂肪酶酯合成活力的影响

1- 己烷; 2- 四氯甲烷; 3- 甲苯; 4- 苯

用水活度衡量水对有机相酶催化的影响更为合理和直观。Halling^[9]在总结了大量实验结

就高。酶在有机溶剂中表现催化活性需要一定的水分, 这一结论已为许多实验所证实^[5], 其主要原因是水分子能够屏蔽酶分子内极强的基团间的静电相互作用, 使酶分子具有足够的柔性, 能够处于催化作用所必需的构象状态^[6]。过量的水使酶活力下降的原因可能是水在酶分子周围形成水簇^[7]。另外, 过量的水导致酶粉凝结以及使逆反应加速也是可能的原因。

通过向反应体系加入水合盐的方法控制体系水活度^[8], 研究水活度对酶活性的影响, 结果见图 2。尽管在不同溶剂中酶活力的最大值不同, 但达到最大值的水活度却基本相同, 均在 $0.5\sim 0.6$ 之间。可见, 相对于水含量,

果的基础上, 提出了相同的观点。

2. 2 有机相中酶的稳定性

2. 2. 1 酶的热稳定性 无水环己烷中, 该酶在 80 的高温下残余活力与保温时间的关系见图 3。保温 2 h 酶活力几乎无损失, 保温 6 h 酶活力仍保留 80% 左右, 说明该酶在无水有机溶剂中具有极高的热稳定性, 较在水溶液中有明显提高; 该酶在水溶液中 80 保温 20 min 酶活力仅残余 20% 左右^[2]。增加水含量会降低酶在有机溶剂中的热稳定性, 将环己烷中水的体积分数提高至 1. 0% 时, 80 保温 6 h 酶活力残留不到 10%。

2. 2. 2 酶的操作稳定性 反应完毕将酶回收, 用于催化下一轮反应, 使用次数与酶活力的关系见图 4。在反应条件下酶活力能基本保持稳定, 连续反应 5 次酶活仍保持在 90% 以上, 这说明该酶在有机溶剂中有较好的操作稳定性。在室温下, 脂肪酶在水溶液中的半衰期只有几天, 而且有可能遭到微生物污染; 但在环己烷中则可放置数日而活力基本没有损失。

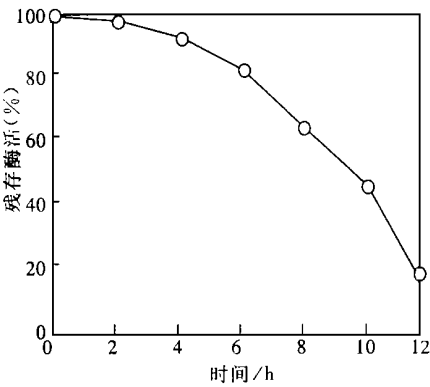


图 3 脂肪酶在无水环己烷中的热稳定性

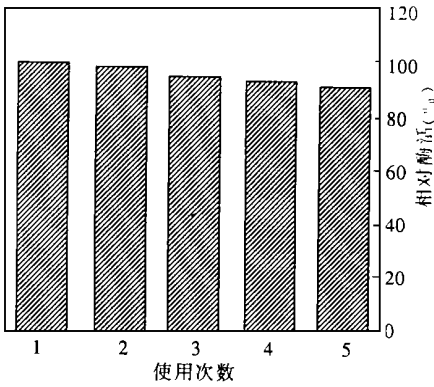


图 4 脂肪酶在无水环己烷中的操作稳定性

2. 3 有机相中脂肪酶的最适作用条件

2. 3. 1 最适作用温度 温度对该酶有机相催化活力的影响见图 5。酶在己烷中的最适温度为 50 , 比水溶液中略高。该酶在水溶液中催化油脂水解的最适温度为 45 ^[2]。

2. 3. 2 最适作用 pH 从不同 pH 值的缓冲液中冷冻干燥得到的酶粉在己烷中的催化活性见图 6。酶的最佳作用 pH 在 9. 0 附近, 与在水溶液中基本相同^[2]。这一现象被称作“pH 记忆(pH memory)”^[10], 许多作者均有报道^[1]。

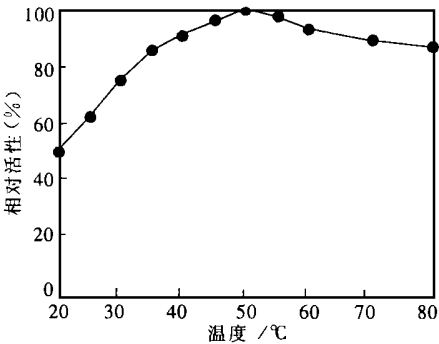


图 5 温度对脂肪酶在环己烷中酯合成活力的影响

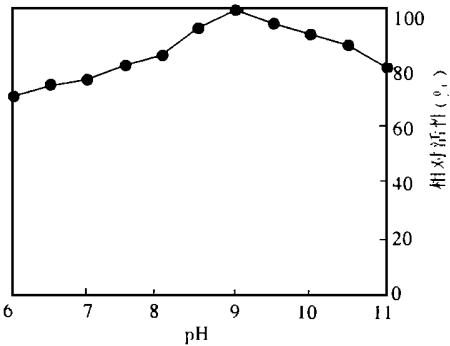


图 6 pH 对脂肪酶在环己烷中酯合成活力的影响

参 考 文 献

- 1 Dordick J S. In: Blanch H W, Clarke D S. Applied Bio-catalysis (Vol 1). New York: Marcel Dekker Inc, 1991. 1 ~ 51
- 2 高修功, 章克昌, 曹淑桂等. 假单胞菌产脂肪酶条件的初步探索. 微生物通报, 1997, 24(3): 152 ~ 155
- 3 孙谨编. 非水滴定(下册), 北京: 科学出版社, 1985. 3
- 4 杨红, 高修功. 有机相中脂肪酶催化不对称酯合成反应动力学研究. 生物化学, 1996, (5): 631 ~ 621
- 5 Zaks A, Klibanov A M. The effect of water on Enzyme Action organic media. J Biol Chem, 1988, 263: 8017 ~ 8021
- 6 Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic Catalysis in nonaqueous solvents. J Biol Chem, 1988, 263: 3194 ~ 3201
- 7 Affleck R, Xu Z F, Suzawa V, et al. Enzymatic catalysis and dynamics in Lower water environment. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1100 ~ 1104
- 8 Kuhl P, Halling P J. Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin-catalysed peptide synthesis. Biochim Biophys Acta, 1991, 1078: 326 ~ 328
- 9 Halling P J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 178 ~ 206
- 10 Zaks A, Klibanov A M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 3192 ~ 3196

Catalytic Properties of Lipase from *Pseudomonas sp.* in Nonaqueous Media

Gao Xiugong Zhang Kechang

(Department of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Cao Shugui

(National Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023)

Abstract The catalytic properties in nonaqueous media of a lipase from *Pseudomonas sp.* were studied by using the esterification of butyric acid with butanol as the model reaction. A small amount of water was found to be necessary for the lipase activity in organic solvents; but the optimum water contents varied considerably among the different solvents, with more hydrophilic solvents usually have higher optimum water contents. When water activity was employed to quantify water, the differences among the solvents disappeared, an optimum water activity of 0.5 ~ 0.6 existed for all the solvents used. The thermal stability of the lipase in organic solvents was significantly higher than that in aqueous solution, it remained almost 80% of the original activity after incubation at 80 °C in cyclohexane for 6h; its activity loss was less than 10% after being successively used for 5 runs. The optimum temperature of the lipase in cyclohexane was 50 °C, which is slightly higher than that in aqueous solution; the optimum pH was 9.0, nearly the same with that in aqueous solution.

Key-words lipase; *Pseudomonas sp.*; nonaqueous medium; catalytic

(责任编辑: 秦和平)