

超高压对解脂耶氏酵母脂肪酶酶活的影响

杨新颖¹, 陈刚¹, 杜焕梅², 缪铭², 冯翥^{*1}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了超高压体系中, 压力、温度、pH 和保压时间对解脂耶氏酵母脂肪酶活性的影响。结果表明: 在超高压作用下, 解脂耶氏酵母脂肪酶的活性有所提高; 经正交试验优化得到在压力 450 MPa、温度 45 °C、pH 7.5、保压时间 10 min 条件下, 脂肪酶活性最高, 为同等条件下常压处理的脂肪酶活性的 220%。经高压处理后, 脂肪酶的最适 pH 较常压条件下向碱性方向移动 0.5。

关键词: 超高压; 脂肪酶; 活性

中图分类号: TS 201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)05—0519—05

Effect of High Hydrostatic Pressure Treatment on the Enzyme Activity of Lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*

YANG Xinying¹, CHEN Gang¹, DU Huanmei², MIAO Ming², FENG Biao^{*1}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. State Key Laboratory of Food and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The study investigated the effects of pressure, temperature, dwell time and pH on the enzyme activity of lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* (YLLIP2) in high hydrostatic pressure (HHP) treatment. Results showed that HHP improved the activity of YLLIP2 and pressure, temperature, dwell time and pH had significant effects on the enzyme activity. Optimal parameters were found by orthogonal test to be pressure 450 MPa, temperature 45 °C, dwell time 10 min and pH 7.5. The optimal pH was increased 0.5 in HHP.

Keywords: high hydrostatic pressure, lipase, enzymatic activity

超高压技术即高静水压技术 (high hydrostatic pressure, HHP), 是一种新型的食品非热加工技术^[1]。一般认为压力超过 100 MPa 就是超高压, 而在实际应用中通常用到的超高压处理范围为 100~1 000 MPa。近年来, 超高压在食品中的应用日益受到关注, 有关超高压下酶活性变化的研究也越来越多。起初超高压技术的应用主要着眼于杀菌钝酶, 但随

着研究的深入, 人们发现超高压也可以提高酶的活性^[2]。不同酶类在经超高压处理后, 在活性方面表现不同。有些酶类在经超高压处理后, 其活性起初会增强, 随着压力的升高又逐渐减弱。超高压加工主要引起酶蛋白的二、三、四级结构变化^[3], 其变性机制与热变性和化学变性剂的变性机制不同。部分蛋白质分子在经超高压处理后不会发生变化, 而且水

收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 教育部博士点基金博导类项目(20130093110009)。

* 通信作者: 冯翥(1953—), 男, 江苏无锡人, 法国博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品加工与配料方面研究。

E-mail: bfeng@jiangnan.edu.cn

引用本文: 杨新颖, 陈刚, 杜焕梅, 等. 超高压对解脂耶氏酵母脂肪酶酶活的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(02): 519-523.

溶液中的共价键也不会受到影响^[4]。

作为一种应用广泛的酶,脂肪酶受到越来越多的关注,而关注的热点主要是其活性和稳定性的变化。在超高压应用于脂肪酶方面,Eisenmenger等^[5]研究得到 *C.antarctica* 脂肪酶(Sigma-Aldrich)在低压下酶活增加 110%,而在高压 350 MPa 下酶活增加了 239%。Noel 等^[6]研究发现超高压可以提高 *R.miehei*(FLUCA)脂肪酶活性。常压下,此酶在 50 ℃ 和 55 ℃ 放置一段时间,相对残余酶活均低至 5%,而在高压下(50~350 MPa)放置相同时间,相对残余酶活可至少分别保持在 60%和 20%。但目前,有关超高压处理脂肪酶及其活性影响的研究还较少,因此本研究中以解脂耶氏酵母脂肪酶为研究对象,以酶活性的变化来分析超高压体系下,压力、温度、pH 和保压时间对脂肪酶活性的影响,为超高压加工技术在激发酶活性方面的研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 解脂耶氏酵母脂肪酶,由北京市生物加工过程重点实验室赠送;橄榄油,酚酞,磷酸二氢钾,二水合磷酸二氢钠,十二水合磷酸氢二钠,聚乙烯醇,氢氧化钠,95%乙醇,分析纯,国药集团上海化学试剂公司产品。

1.1.2 实验设备 S-FL-085-09-W 型超高压仪器,英国 Stansted Fluid Power 公司产品;Allegra 25R 型台式高速冷冻离心机,美国贝克曼公司产品;99-1A 型磁力搅拌器,金坛荣华仪器有限公司产品;高速匀浆机,德国 IKA 公司产品;EL20K 型酸度计,EL104 型电子分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司产品;DKB-501A 型超级恒温水浴,上海森信实验仪器有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 脂肪酶水解活力检测 见 GB/T 23535—2009 指示剂滴定法^[7]。

脂肪酶活性以脂肪酶活性单位表示,定义为在一定温度和 pH 条件下,1 min 水解底物产生 1 μmol 的可滴定脂肪酸所需要的酶量,即为 1 个酶活单位。相对残余酶活定义为高压处理后的脂肪酶活性/对照组脂肪酶活性,对照组为 pH 7.5、40 ℃、常压下处理 10 min 的脂肪酶。

1.2.2 高压下不同因素对脂肪酶活性的影响 称

取脂肪酶 0.15 g,溶于 10 mL 0.25 mol/L 的一定 pH (6.0~8.5)的磷酸缓冲液,混匀。8 000 r/min(4 ℃)高速离心 20 min,然后取上清液于 100 mL 的容量瓶定容,在特定压力(0.1~600 MPa)、特定温度(40~60 ℃)下处理一段时间(5~50 min),取出后立即测其活性。

1.2.3 脂肪酶的复原性分析 将处理后的脂肪酶于 4 ℃ 下静置一定时间(0~2 h),分别于不同时间取出检测其活性。

1.2.4 正交试验 根据前期试验结果,选取 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验。

2 结果与讨论

2.1 压力对脂肪酶活性的影响

选取脂肪酶的最佳作用温度 40 ℃,最佳作用 pH 7.5,在温度 40 ℃、pH 7.5 时,分别在 0.1~600 MPa 处理 10 min 后,相对残余酶活如图 1 所示。

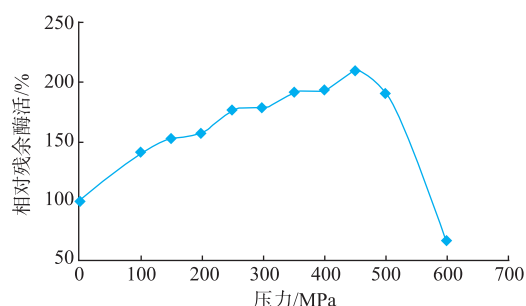


图 1 压力对 *Y. lipolytica* 脂肪酶活性的影响

Fig. 1 Effect of pressure on the activity of *Y. lipolytica* lipase

当压力低于 500 MPa 时脂肪酶活性均比 0.1 MPa(未经高压处理)的脂肪酶活性高,在 100~450 MPa 压力范围内,相对残余酶活随压力的增加而增大,当压力为 450 MPa 时酶活达到最大值,为常压下脂肪酶活性的 209%;当压力超过 450 MPa 后,相对残余酶活开始降低,600 MPa 时,相对残余酶活大大低于 0.1 MPa 下酶活。前人的研究指出,某些脂肪酶在高压作用下,维持活性中心的非共价键发生变化,导致酶活性增高。但同时高压对蛋白质也有钝化作用。因此,当压力达到一定值后,酶活性将下降。不同来源的脂肪酶活性提高的幅度不同,活性最高时对应的压力值也不相同。通过实验发现,当压力超过某个特定值时(在特定时间内)酶的活性会迅速下降直到完全失活,这个特定压力值被称为最低失活压力。本实验中脂肪酶的最低失活压

力在550 MPa左右。本实验中的趋势与前人^[8]的研究结果一致,但最高活性对应的压力值比较高,说明该脂肪酶具有较好的抗压稳定性。

2.2 高压下温度对脂肪酶活性的影响

在0.1 MPa和450 MPa下(pH7.5),分别在不同温度(40~60 ℃)处理10 min,结果如图2所示。可以看出,常压下,酶的活性在温度高于40 ℃后由于蛋白质的热变性而急剧下降;而高压处理增加了酶的稳定性,以至于温度达到45 ℃时酶的活性达最高值,相对残余酶活为220%。45 ℃以后高压下酶的活性迅速下降,但仍比同等条件常压下的酶酶活高。由此可知,脂肪酶不耐高温,高温下活性很低。这是因为脂肪酶的空间构象由于高温发生了变化,从而导致部分失活。非共价键是维持酶活性中心结构的主要因素,外来能量的供给影响非共价键的化学解离,温度越高,越有可能使非共价键发生解离^[9]。而在超高压体系中,压力诱导的酶的稳定与热失活拮抗,因为压力会改变酶活性中心周围的构象,使酶的空间结构得到保护,从而使得酶的耐热能力提高。用Sun等^[10]的观点解释就是,在分子层面上,压力和热是拮抗的。从实验结果来看,高压对于高温引起的热变性具有显著的拮抗作用。

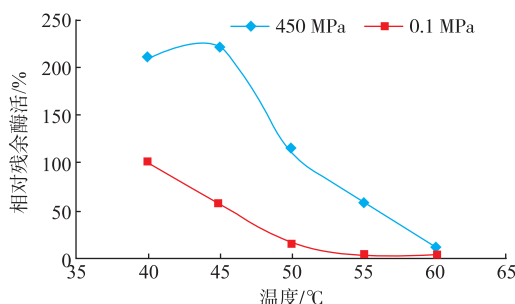


图2 温度对 *Y. lipolytica* 脂肪酶活性的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the activity of *Y. lipolytica* lipase

2.3 高压下 pH 对脂肪酶活性的影响

将溶于不同 pH 缓冲液的脂肪酶置于40 ℃条件下,分别在0.1 MPa和450 MPa下处理10 min,研究高压处理前后 pH 与脂肪酶活性的关系,结果如图3所示。可知,0.1 MPa下,脂肪酶的最适 pH 为7.0,并且相对残余酶活随着 pH 的增加先上升后下降。而经高压处理后,随着 pH 的增加,酶活的变化趋势与常压下一致,但 pH 7.5 时,脂肪酶的活性最高。pH 6.0~7.0 时,常压与450 MPa处理的脂肪酶

酶活基本相同。脂肪酶经高压处理后,最适 pH 值向碱性方向移动0.5,且在碱性条件下有更好的耐受性。这一结果受到不同因素的影响。首先,体系的 pH 经过高压处理会发生变化。Heremans^[4]等曾经通过实验发现随着压力的升高,苹果汁的 pH 会降低,且压力相差500 MPa, pH 便可相差近1个单位;其次,则是酶本身的特殊性,其化学本质是蛋白质,是一种两性物质,所以酶分子的解离状态可能受到压力的影响而发生改变,影响酶的活性。

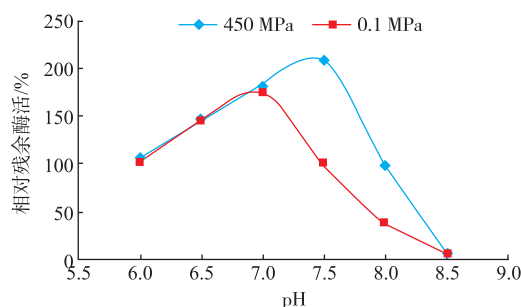


图3 高压下 pH 对 *Y. lipolytica* 脂肪酶活性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the activity of *Y. lipolytica* lipase

2.4 保压时间对脂肪酶活性的影响

将溶于 pH7.5 磷酸盐缓冲液的脂肪酶置于40 ℃条件下,分别在0.1 MPa和450 MPa下处理不同时间,测得脂肪酶活性的变化,得到图4。

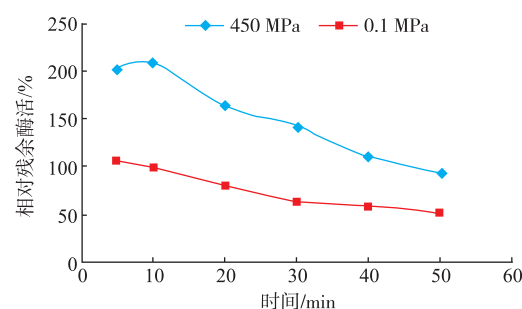


图4 保压时间对 *Y. lipolytica* 脂肪酶活性的影响

Fig. 4 Effect of dwell time on the activity of *Y. lipolytica* lipase

由图4可知,常压下,酶活性随着保压时间的延长逐渐降低,经高压处理的脂肪酶酶活先上升后下降,在10 min时达到最大值,但任何保压时间下,经450 MPa加压处理的脂肪酶活性都比常压下的脂肪酶活性高,说明加压可以抵抗脂肪酶的热变性。在压力一定的时候,脂肪酶的激活或酶结构的破坏与保压时间密切相关。励建荣等^[11]曾经提出过,随着保压时间的增长酶的活性通常会降低。

2.5 高压处理后的脂肪酶的复原性分析

高压处理脂肪酶的复原性分析如图 5 所示。常压下处理的脂肪酶活性没有反弹或者波动,比较稳定。高压处理的脂肪酶活性先降低后趋于稳定,相对残余酶活降低 20%左右。实验中,16 h 后对其酶活进行检测,仍保持稳定。表明高压解除后,脂肪酶构象部分恢复。因为适当的压力范围并不会对酶的结构造成破坏性的影响,只是对结构有挤压作用,当压力释放并静置于常压下时,这些被挤压的结构就会缓慢的复原,所以就出现了酶的复原性。张瑜^[12]等的研究结果显示某脂肪酶(诺维信公司)在常压下处理后,其活性未发生反弹,高压处理后活性在 48 h 后均有所增加。尹曼等^[13]研究发现,150 MPa 和 200 MPa 下,随着贮存时间的增长皱褶假丝酵母脂肪酶的活性先升高后下降,最终处于钝化状态;在贮存 1 h 后,活性达到最高。通过对这些实验结果的比较分析可以得知,压力释放后,静置在常压下,酶蛋白结构的恢复有可能使酶活提高也有可能使酶活降低,不同的酶会有不同的反应。

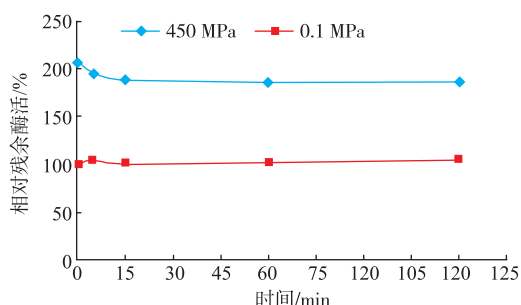


图 5 高压处理后的脂肪酶的复原性分析

Fig. 5 Resilience of lipase activity after HHP treatment

2.6 正交试验

根据前期试验结果,综合考虑选取压力、温度、时间三个因素设计正交试验,选取 $L_9(3^3)$ 正交表,具体方案和结果见表 1—2。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experimental design

水平	因素		
	A 压力/MPa	B 温度/℃	C 时间/min
1	425	42	5
2	450	45	10
3	475	48	15

表 2 正交试验方案和结果

Table 2 Design scheme and results of the orthogonal experiment

试验号	试验方案			试验指标
	A	B	C	相对残余酶活
1	1	1	1	1.76
2	1	2	2	2.18
3	1	3	3	1.29
4	2	2	1	2.06
5	2	3	2	1.36
6	2	1	3	1.85
7	3	3	1	1.52
8	3	1	2	1.82
9	3	2	3	1.25
K_1	5.23	5.43	5.34	
K_2	5.27	5.49	5.36	
K_3	4.59	4.17	4.39	
k_1	1.74	1.81	1.78	
k_2	1.76	1.83	1.79	
k_3	1.53	1.39	1.46	
极差 R	0.23	0.44	0.32	
主次顺序	B>C>A			
最优组合条件	$A_2B_2C_2$			

结果表明,在选取因素的数值范围内,温度对脂肪酶活性的影响最大,其次是反应时间,压力大小影响最小。结合前面实验结果得到脂肪酶活性最高的条件为:450 MPa,45 ℃,反应时间 10 min。在最优条件下,脂肪酶的相对残余酶活达到 220%。

3 结 语

在高压体系中,压力、温度、保压时间和 pH 等因素与脂肪酶的活性密切相关。在压力 450 MPa、温度 45 ℃、pH 7.5、保压时间 10 min 条件下,脂肪酶活性为同等条件下常压处理的脂肪酶的 220%。常压下,酶的活性在温度高于 40 ℃后由于蛋白质的热变性而急剧下降;而高压处理增加了酶的稳定性,以至于温度达到 45 ℃时酶的活性达最高值,酶活提高了 100%以上。高压处理的脂肪酶,pH 7.5 时的活性最高,与常压处理的脂肪酶相比最适 pH 向碱性移动 0.5。随着保压时间的延长,经高压处理的脂肪酶酶活先上升后下降,保压时间为 10 min 时,脂肪酶活性最高。高压处理后,随着贮藏时间的延长酶活会先下降,之后保持稳定;高压解除后,脂肪酶构象部分恢复。

参考文献:

- [1] MOAZHAEV V V, HEREMANS K, FRANK J, et al. Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications[J]. **Trends in Biotechnology**, 1994, 12(12): 493-501.
- [2] JIANG Bo, MIAO Ming. Catalytic system of food enzyme under hydrostatic high pressure; status and trends[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2011, 11(9): 93-97. (in Chinese)
- [3] KNORR D, HEINZ V, BUCKOW R. High pressure application for food biopolymers[J]. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, 2006, 1764(3): 619-631.
- [4] HEREMANS K. High pressure effects on proteins and other biomolecules [J]. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, 1982(11): 1-21.
- [5] EISENMENGER M J, REYESDC J I. High pressure enhancement of enzymes; A review [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2009, 45(5): 331-347.
- [6] NOEL M, LOZANO P, COMBES D. Polyhydric alcohol protective effect on Rhizomucor miehei lipase deactivation enhanced by pressure and temperature treatment[J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2005, 27(6): 375-380.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23535—2009 脂肪酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] GOMES M R A, LEDWARD D A. Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases[J]. **Food Chemistry**, 1996, 56(1): 1-5.
- [9] ZENG Qingmei, PAN Jian, XIE Huiming, et al. Effect of high pressure treatment on peroxidase (POD) activity in pear juice[J]. **Transactions of the CSAE**, 2004, 20(4): 199-202. (in Chinese)
- [10] SUN M M C, CLARK D S. Pressure effects on activity and stability of hyperthermophilic enzymes[J]. **Methods in Enzymology**, 2001, 334: 316-327.
- [11] LI Jianrong, YU Jian. Effect of high pressure treatments on enzyme activeness[J]. **Food Science and Technology**, 2006(9): 18-20. (in Chinese)
- [12] 张瑜. 超高压对脂肪酶活性的影响及其机制初探[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [13] 尹曼. 动态高压微射流技术对脂肪酶活性与构象的影响[D]. 南昌: 南昌大学, 2011.