

文章编号 :1009 - 038X(2001)03 - 0257 - 04

解脂假丝酵母脂肪酶的纯化及性质研究

徐 岩 , 李建波 , 王 栋

(无锡轻工大学生物工程学院 ,江苏无锡 214036)

摘 要 :通过采用盐析和透析等提纯方法 ,对解脂假丝酵母(*Candida lipolytica*)脂肪酶进行了纯化 ,比活提高了 2.69 倍 ,回收率 45% .该酶反应的最适 pH 值为 7.5 ,最适温度为 38 ℃ ,pH 稳定范围为 6.0 ~ 7.5 ,温度稳定性较差 ,以 2 mol/L 的蔗糖作保护剂效果较好 .该酶为金属酶 ,5 mmol/L 的钙离子有较好的活化效果 .

关键词 :解脂假丝酵母 ;脂肪酶 ;纯化 ;稳定性

中图分类号 :Q814.1

文献标识码 :A

Purification and Properties of the Lipase from *Candida lipolytica*

XU Yan , LI Jian-bo , WANG Dong

(School of Bioengineering , Wuxi University of Light Industry , Wuxi 214036 , China)

Abstract : By means of salting out and dialysis , the lipase from *Candida lipolytica* was purified with the results of the specific activity 2.69 times higher and the activity recovery of 45% . The property research shows that the optimum pH and temperature of crude enzyme were 7.5 and 38 ℃ respectively and that the stabilization range of pH was 6.0 ~ 7.5 . With lower temperature stabilization , it was found that the 2 mol/L saccharose was better protectant than others . Being metalloenzyme , the lipase has better activation in presence of 5 mmol/L calcium ion .

Key words : *Candida lipolytica* ; lipase ; purification ; stabilization

目前发现的微生物中有近 60 个种属产脂肪酶 ,工业化生产的就有近 20 种 .微生物脂肪酶的作用 pH 范围、作用温度范围以及对底物的专一性比动植物酶广 ,便于进行工业生产和获得高纯度制剂 .微生物脂肪酶在酶理论研究及实际应用方面发展迅速^[1] ,已应用于食品、皮革、油脂化工等行业以及洗涤剂、化妆品、医药等方面 .有关 *Rhizopus delemere*、*Mucor meihei*、*Aspergillus niger*、*Pythium ultimum* 和 *Geotrichum candidum* 等脂肪酶的纯化和性质已有众多文献报道^[2~5] .

我国在 20 世纪 60 年代就开展了微生物脂肪酶的研究 ,并在 1969 年试制解脂假丝酵母脂肪酶制剂并供应市场 .工业化生产解脂假丝酵母脂肪酶已有 30 年历史 ,但对其性质的研究却鲜有报道 ,尽管有研究者^[6]曾作过此方面的研究 ,但由于产酶菌种的变化 ,酶学性质也发生了很大变化 .该酶是一种粗酶制剂 ,含有大量硫酸铵、硫酸钠以及其它杂质 ,直接应用会受到很大限制 .作者发现 ,此酶主要是以菌体形式存在的胞内酶 ,胞外酶活为 140 u/g ,而胞内酶活却高达 4 000 u/g 以上 .作者首先通过菌

收稿日期 2000 - 11 - 24 ;修订日期 2001 - 03 - 22 .

基金项目 江苏省科委应用基础项目(BJ99037)和教育部高等学校骨干教师资助计划项目资助课题 .

作者简介 徐岩(1962 -) ,男 ,浙江慈溪人 ,工学博士 ,副教授 .

体破碎、盐析和透析等操作对该酶进行初步纯化，然后进行常规的酶学性质研究。

1.材料与方法

1.1 试剂与仪器

解脂假丝酵母脂肪酶:比活 4.2 u/mg,产酶菌株为 *Candida* 415,无锡酶制剂厂提供;PVA(聚乙 烯醇 124):分析纯,日本进口分装,上海化学试剂站 分装厂产品;橄榄油:试剂纯,上海化学试剂供应站 提供.其它试剂均为分析纯或化学纯.

U-3000 紫外分光光度计:日本日立公司出品; 超声波细胞破碎仪:HP 公司出品;冷冻高速离心 机:CTFD-2,日本日立公司出品;透析袋:截留相对 分子质量为 8 000~12 000,进口产品.

1.2 实验方法

1.2.1 酶活力测定 碱滴定法^[7].活力定义:在 40 ℃ pH 7.5 条件下,每分钟催化脂肪水解生成 1 μmol 脂肪酸的酶量为 1 个酶活力单位.

1.2.2 蛋白质测定 采用紫外吸收法^[8],经验公 式为:蛋白质质量浓度(mg/mL)=1.45A₂₈₀- 0.74A₂₆₀.

1.2.3 盐析范围的确定 取一定体积粗酶液,分 几次加入不同量的硫酸铵,第一次加完硫酸铵后, 静置 2 h 左右,离心得第一个分级沉淀,上清液以同 样的操作加硫酸铵,得到第二个分级沉淀,如此连 续进行,便可得到多个分级沉淀,将每个分级沉淀 重新溶解于一定体积的 pH 7.5 磷酸缓冲液中,分 别测定蛋白质含量和酶活.(注:整个过程在低温下 操作,并始终控制酶液 pH 在 7.5 左右)

1.2.4 酶的纯化 酶粉溶入缓冲液,超声波破碎 (10 min)→低温离心(7 000 r/min,15 min)→上清 液(粗酶液)→硫酸铵(饱和度 30%)沉淀 2 h→低温 离心→上清液→硫酸铵(饱和度 60%)沉淀 2 h→低 温离心→沉淀加磷酸缓冲液溶解→低温透析(pH 7.5 磷酸缓冲液)

2 结果与讨论

2.1 脂肪酶的纯化

2.1.1 盐析范围的确定 硫酸铵分级试验结果见 表 1,可确定盐析范围为 30%~60%.在饱和度为 60%时,蛋白质已完全沉淀,但酶活回收率仅为 88. 9%,可见酶在盐析过程中有部分失活.因此有必要 考察酶的稳定性,寻找合适的保护剂,降低酶在放

置过程中失活的速度.

表 1 硫酸铵盐析试验结果

Tab.1 The effects of (NH₄)₂SO₄ saturation on purification

试验 次数	饱和 度/%	相对酶 活/%	蛋白质 质量浓度/ (mg/mL)	纯化 倍数	备 注
第一次	0~20	15.8	21.1	0.75	酶在饱和度为 20%~40%盐析 范围内沉淀最 多,但纯化倍数 不高,而 40%~ 60%的纯化倍数 较高,所以改试 30%~60%
	20~40	53.1	69.9	0.76	
	40~60	20.0	9.0	2.22	
第二次	0~30	43.7	77.6	0.56	30%~60%盐析 范围酶活回收 率和纯化倍数 均较高.
	30~60	45.2	22.4	2.02	

2.1.2 酶的纯化 将盐析范围为 30%~60%的分 级沉淀透析过夜,分别计算抽提后的粗酶液、盐析 后的酶液及透析后的酶液的比活和酶活回收率,见 表 2.

表 2 脂肪酶纯化结果

Tab.2 Summary of lipase's purification

纯化步骤	酶活回收率/ %	比活力/ (u/g)	纯化倍数
抽提后	100	46562	1.00
盐析后	45.2	94059	2.02
透析后	45.0	125406	2.69

2.2 粗酶酶学性质研究

在脂肪酶纯化过程中,酶活有一定的损失,作 者对脂肪酶粗酶液进行了一系列的温度稳定性和 pH 稳定性研究.

2.2.1 脂肪酶的温度稳定性 将粗酶液分别在 35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃下放置 30 min,酶活回收率分 别为 50.2%、33.3%、0、0.该酶在高于 40℃的条件 下极易失活.将粗酶液室温放置 1 h、2 h、3 h、4 h, 测定酶活,结果见图 1.

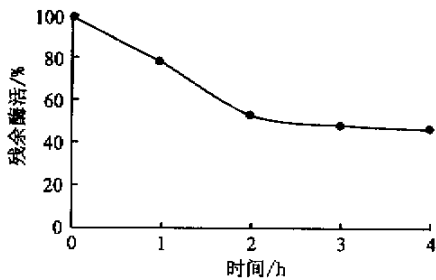


图 1 室温下脂肪酶的稳定性

Fig.1 Thermal stability curve for lipase at ambient temperature

室温条件下 ,该酶在 2 h 内酶活下降很快 ,2 ~ 4 h 内酶活较为稳定 .在将粗酶液冷冻干燥之后 ,发现酶活损失仍然很大 ,所以进一步研究该酶在低温下的稳定性 ,将粗酶液分别于室温、冷藏(4℃)和冷冻条件下放置 ,结果见图 2 .

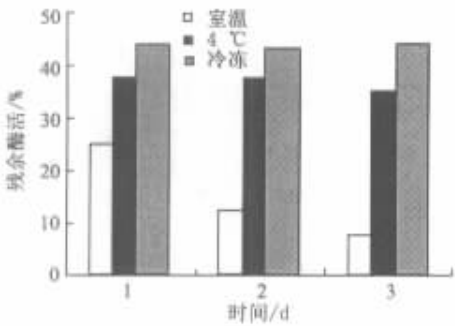


图 2 不同条件下脂肪酶的温度稳定性

Fig.2 Thermal stability curve for lipase at different conditions

在第 1 天 ,酶在 3 种放置方式下失活速度都很快 ,1 天后较稳定 .从图 1、图 2 可知 ,该脂肪酶在放置的开始阶段酶活损失很快 ,后趋于稳定 ,可以推测此酶由两类脂肪酶组成 ,其中一类稳定性很差 ,即使在低温下也很容易失活 ,属于冷不稳定酶 ;而另一类相对较稳定 ,但如果温度升高 ,也会很快失活 .

2.2.2 脂肪酶的 pH 稳定性

酶的稳定性除了受温度影响外 ,pH 也是一个重要因素 .现分别用 0.025 mol/L 的不同系列磷酸缓冲液 (pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.2、pH 9.0)溶解酶(粗酶液经冷冻干燥) ,室温放置 2 h、4 h、6 h ,分别测定酶活 ,结果见图 3 .

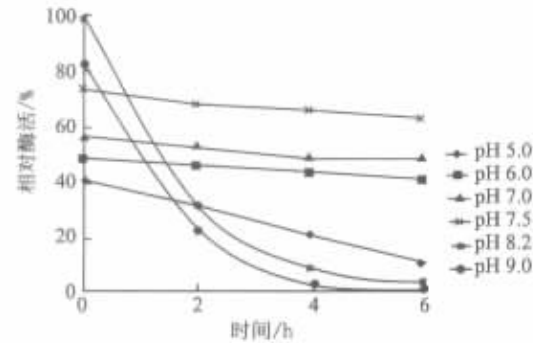


图 3 酶在不同 pH 下的活力和稳定性

Fig.3 Effect of pH on lipase activity and stability

可以看出 :在 pH 6.0、7.0 和 7.5 下该酶的稳定性较好 ,放置 6 h ,酶活下降幅度不大 .在 pH 5.0、8.2 和 9.0 下该酶极易失活 ,6 h 后 ,酶活接近于 0 .因此 ,该酶的稳定 pH 范围为 6.0 ~ 7.5 .

2.2.3 酶的保护剂 从上面对酶的稳定性研究可

知 ,该酶很不稳定 ,有必要寻找酶的保护剂 .多羟基化合物对酶有保护作用 ,在粗酶液中分别加入 0.1 mol/L 的蔗糖、乳糖、葡萄糖和甘油 ,不加的作为对照 ,室温下放置 4 h ,分别测定酶活 ,结果见图 4 .

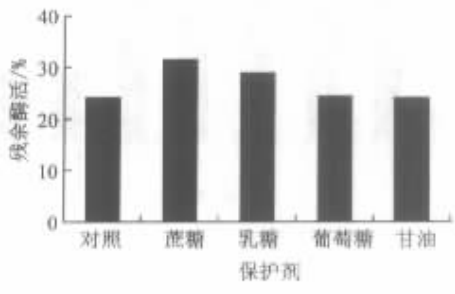


图 4 保护剂的选择

Fig.4 Effect of protectant on activity

由图可知 :蔗糖、乳糖对酶有保护作用 ,而葡萄糖、甘油几乎没有保护作用 .初步确定保护剂为蔗糖和乳糖 .然后对保护剂的添加量进行研究 :在粗酶液中分别加入 0.1 mol/L、0.5 mol/L、1 mol/L、2 mol/L 的蔗糖和 0.1 mol/L、0.5 mol/L、1 mol/L 的乳糖 (受溶解度的限制 ,浓度不能更高) ,不加的作为对照 ,室温下放置 4 h ,分别测定酶活 ,见表 3 .

表 3 保护剂的添加量

Tab.3 Effects of the protectant addition on activity

样品	浓度/(mol/L)	残余酶活/ %
对照	0	23.4
	0.1	29.8
蔗糖	0.5	40.6
	1.0	72.5
	2.0	96.5
	2.0	96.5
乳糖	0.1	26.6
	0.5	44.7
	1.0	45.6

可以看出 :2 mol/L 的蔗糖保护效果最好 ,4 h 后酶活还有 96.5% .因此选 2 mol/L 蔗糖作保护剂 .

2.2.4 金属离子对酶活的影响

某些金属离子与酶结合 ,对酶的最佳活力构象起稳定作用 ,有利于底物的接近 ,并起着酶-金属-底物三者间的诱导应变配位 ,从而活化或加强酶的催化活性 .选择合适的活化离子对酶的利用有一定的价值 .向粗酶液中分别加入 5 mmol/L 的 NaCl、KCl、CaCl₂、MgSO₄、FeSO₄ 和 CuSO₄ ,不加离子的作为对照 ,分别测定酶活 .

图 5 可知 ,镁离子、钙离子活化效果较好 ,可以作为活化剂 ;亚铁离子、铜离子对该酶有抑制作用 ,属于抑制剂 .向粗酶液中分别加入 5 mmol/L、10

mmol/L 和 50 mmol/L 的 MgSO_4 与 CaCl_2 ,不加金属离子的作为对照 ,分别测定酶活.

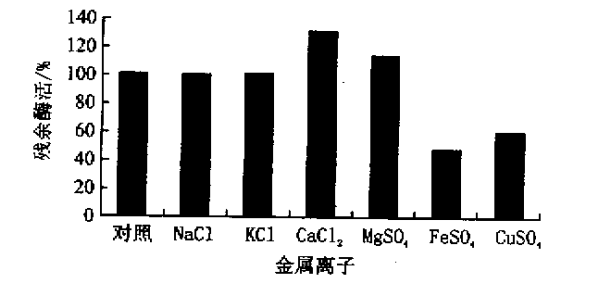


图 5 金属离子对酶活的影响
Fig.5 Effect of metal ions on activity

表 4 活化剂的添加量

Tab.4 Effect of activator addition on activity

样品	浓度/(mmol/L)	残余酶活/%
对照	0	100
	5	113
	10	91.9
	50	54.2
MgSO ₄	5	130
	10	130
	50	87.5
CaCl ₂	5	130
	10	130
	50	87.5

由表 4 可知 ,5 mmol/L 或 10 mmol/L 的钙离子对该酶的活化作用最好 ,可使酶活提高 30% .而随着镁离子、钙离子浓度的升高 ,活化效果下降 ,甚至出现抑制现象 ,这可能是由于过量的金属离子对酶蛋白产生竞争结合 ,使酶的构象偏离其最佳活力构象 ,而使酶活降低 .这也是活化剂的特点之一 .可选定酶液中 CaCl_2 的添加量为 5 mmol/L .

2.2.5 EDTA 对酶的影响 由于该酶可被金属离子活化 ,所以其活性中心可能有金属离子 ,属于金属酶 .在粗酶液中加入 5 mmol/L 的 EDTA ,低温放

置 30 min ,酶活测定 ,结果为 0 ,这是因为 EDTA 螯合了维持酶活性中心结构的金属离子 ,使酶失活 ,据此推断该酶为金属酶 .

2.2.6 脂肪酶的最适水解 pH 值 分别用 0.025 mol/L 的不同系列磷酸缓冲液(pH 5.9、pH 6.2、pH 6.5、pH 6.8、pH 7.1、pH 7.4、pH 7.5、pH 7.7、pH 8.0)取代酶活测定方法中的缓冲液 ,酶活测定结果见图 6 .由图可知 ,该酶的最适水解 pH 值为 7.5 .

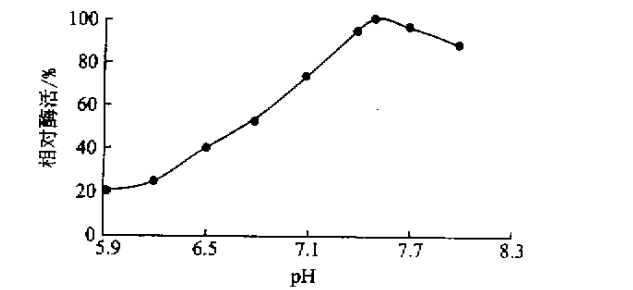


图 6 最适作用 pH 曲线

Fig.6 Effect of pH on activity

2.2.7 脂肪酶的最适水解温度 分别用不同的反应温度(25 ℃、30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃)取代酶活测定方法中的 40 ℃ ,测定酶活 ,由图 7 可知 ,该酶的最适水解温度为 38 ℃ .

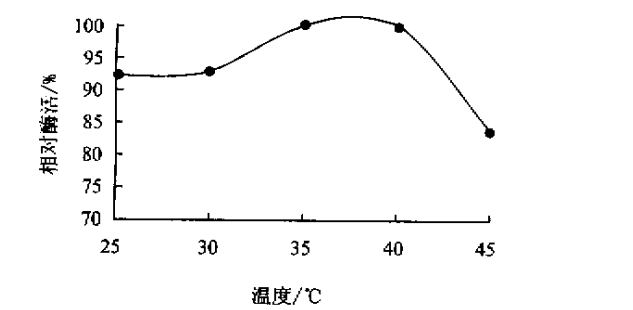


图 7 温度对脂肪酶水解活力的影响

Fig.7 Effect of temperature on activity

参考文献：

[1] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京 : 科学出版社 ,1989 .
[2] MEIKO Iwai , YOSHIO Tsujisaka. The Purification and the Properties of There Kind of Lipases From Rhizopus delemee[J].
Agr Biol Chem ,1974 38(6) :1241 ~ 1247 .
[3] BIRGITTE Høge-Jensen , DONNA Rubano , ROBERT G. Studies on Free and Immobilized Lipases from Mucor miehe[J].
JAOCS ,1988 65(6) 905 ~ 910 .
[4] MICHAEL J H , DAVID J C , DAVID G B. Purification and Characterization of an Extracellular Lipases from the Fungus Rhizopus Delema[J]. Lipids ,1992 27(8) 571 ~ 576 .
[5] ZAHID M , JOHN D W. Purification and Characterization of an Extracellular Lipases from Pythium Ultiman[J]. Lipids ,1993 ,
28(5) 377 ~ 382 .
[6] 姜延程 ,谢文磊 ,张文新. 解脂假丝酵母胞外脂肪酶的提纯和性质[J]. 吉林大学自然科学学报 ,1996(3) 91 ~ 95 .
[7] 郭勇主编. 酶工程[M]. 北京 : 中国轻工业出版社 ,1994 317 ~ 319 .
[8] 李如亮主编. 生物化学实验[M]. 武汉 : 武汉大学出版社 ,98 54 ~ 57 .