

反胶团中脂肪酶催化性能的研究

许建和 茅庆成 英徐根 胡 英

(华东化工学院热力学研究室, 上海)

研究了皱褶假丝酵母脂肪酶在 AOT/异辛烷反胶团中催化橄榄油水解的性能。发现在 25℃, pH7.9, $R = [H_2O]/[AOT] = 10$ 的条件下, 脂肪酶的活力最高。脂肪酶在含水量较低的反胶团中较稳定, 当 $R = 5.4$, 于 33℃ 保存 12 h, 活力可保持 89%; 底物浓度高达 50% (V/V) 时仍无抑制; 当“水池”内存在 40mmol/L 的 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子时对酶仅有少许抑制。

关键词 反胶团; 脂肪酶; 催化性能

表面活性剂在非极性有机溶剂中超过临界胶团浓度时即自发聚结成球状的反胶团。反胶团的重要特性之一, 是在有机溶剂中增溶相当多的水溶性化合物, 形成只有纳米级大小的微型“水池”。1978年 Martinek^[1] 和 Luisi^[2] 等人发现, 胰凝乳蛋白酶被包埋于有机溶剂反胶团中仍具有催化活力。这一发现立即引起生物工程界的广泛兴趣, 并由此诞生了一门新的交叉学科——反胶团酶催化。

目前世界上已有数十家实验室致力于研究反胶团酶催化^[2]。所研究的酶包括水解酶、转移酶和氧化还原酶等各种类型。研究的内容主要集中于反胶团酶的活力及光谱特性。近年来开始注意应用性技术开发, 如反应器设计、产物的分离和酶的回收利用^[3]。本文选用油脂工业上应用价值较大的微生物脂肪酶, 在 AOT/异辛烷反胶团中, 进行了催化橄榄油水解的实验研究, 对影响酶活力和稳定性的主要因素, 如温度、pH 值、含水量等, 逐一进行了条件优化, 确定了反应的最佳条件。

材料与 方法

(一) 材料

丁二酸双(2-乙基己基)酯磺酸钠, 商品名为气溶胶 OT(或 AOT), 上海试剂二厂产品, 使用前按文献[4]方法提纯, 经 UV 检验杂质含量显著降低。异辛烷, 即 2, 2, 4-三甲基戊烷, 西德进口分装, 精馏后用 3A 分子筛干燥, 含水量一般超过 30ppm。橄榄油, 进口分装, 3A 分子筛干燥后直接使用。脂肪酶, 日本进口制剂(商品名 Lipase My), 系从皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*) 中提取纯化而得。

(二) 反胶团脂肪酶的制备及活力测定

典型实验如下: 移取 5.0ml 含 10% (v/v) 橄榄油和 50.0mmol/L AOT 的异辛烷溶液于带塞试管中, 在 $33 \pm 0.1^\circ C$ 恒温水浴中预热 20min。然后注入 50 μ l 脂肪酶缓冲液, 立即在试管振荡器上涡旋混合至溶液澄清, 并开始计时。继续保温 30min 时, 取 0.4ml 反应混合液加入盛有 4.6ml 苯和 1.0ml 显色剂 (4% 醋酸酐 + 吡啶, pH6.1) 的试管中, 立即振荡混合 1 ~

本文于 1990 年 4 月 2 日收到。

国家自然科学基金项目(编号: 2880260), 并获国家教委基金资助。

中国科学院微生物研究所徐家立先生提供了脂肪酶制剂, 并与作者进行了有益的讨论, 特此感谢。

2 min, 终止反应。经搁置或离心, 至分层澄清后取上层有机相, 以同法制备但不含脂肪酶的空白溶液作参比, 用分光光度法测定 710nm 波长的吸光度^[6]。对照脂肪酸吸光度标准曲线^[6]即可求得脂肪酸含量。〔除特别指明外, 缓冲液为 50mmol/L 的磷酸盐, pH=7.1; $R = [H_2O] / [AOT] = 12.0$ 。〕

结果与讨论

(一) 溶剂的选择

表 1 列出了一些常见烃类溶剂对 AOT 反胶团中脂肪酶活力的影响, 同是非极性溶剂, 对反胶团酶活力的影响却大不相同。异辛烷是最好的溶剂, 酶在其中的稳定性最好。苯作溶剂时酶几乎完全失活, 因此宜用作失活剂。从表 1 还可看出如下规律: 长链的烷烃比短链的好, 支链的或环状的又比直链的好。可能是分子量和空间阻碍较大的烷烃对 AOT 反胶团的稳定作用较大, 而它们扩散进入“水池”与酶分子发生作用的机会则相对较少。

表 1 脂肪酶被 AOT 增溶于各种有机溶剂中的相对活力
Table 1 Relative activities of lipase in reverse micelles stabilized by AOT in various organic solvents

有机溶剂 Organic solvent	相对活力 Rel. activity (%)
Isooctane	100
Normal octane	39 ± 5
Normal hexane	28 ± 3
Cyclohexane	38 ± 3
Benzene	1 ~ 2
Toluene	4 ~ 6
Petroleum ether	23 ± 2
59mmol/L n-Butanol/isooctane	25 ± 9
49mmol/L n-Pentanol/isooctane	35 ± 6
47mmol/L n-Hexanol/isooctane	46 ± 4

(二) 反应曲线

脂肪酶在反胶团中的反应曲线见图

1。由图可见, 在底物浓度一定(本例为 10%, v/v)的情况下, 酶浓度较少时初速度时间较长。一般在 30min 之内可保持线性, 因此在测定酶活力时将反应时间控制在 30min 为佳。酶在反胶团中的活力(直线的斜率)与所注入酶的浓度(活力) $[E]_{a_0}$ 成正比。二者之比即反胶团化酶的活力回收率, 约为 60%。其中 $[E]_{a_0}$ 是按经典方法^[7], 在橄榄油浓度为 25% (v/v) 的 PVA 乳化液中, 温度为 30°C 及 pH7.5 的最佳条件下测定的。

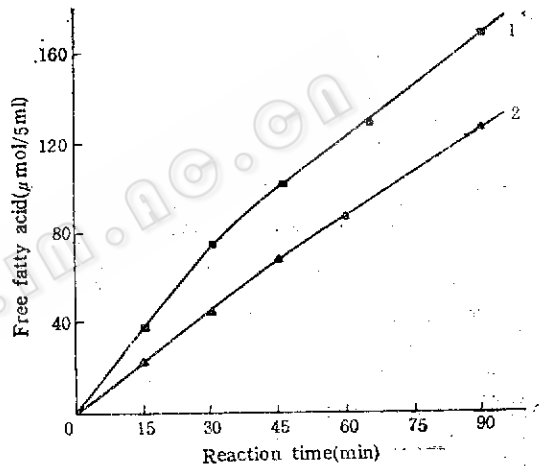


图 1 脂肪酶在 AOT/异辛烷反胶团中的反应曲线 (33°C)

Fig. 1 The reaction curve of lipase in AOT/isooctane reverse micelles at 33°C

1. $[E]_{a_0} = 85 \mu\text{g/ml}$, 2. $[E]_{a_0} = 51 \mu\text{g/ml}$

(三) 温度的影响

脂肪酶在反胶团中的活力与反应温度的关系见图 2。由图可知, 在本文条件下脂肪酶在反胶团中的最适温度在 25°C 左右。在 25°C 以下, 酶活力随温度的变化符合 Arrhenius 方程。由直线斜率可求得反应活化能为 $E_a = 43.1 \text{ kJ/mol}$ 。这与脂肪酶在 AOT/正庚烷系统中催化对硝基苯酚脂肪酸酯水解的活化能 (44 kJ/mol)^[8] 非常接近, 与文献^[9] 报道的乳液系统中的 22.1~100.7 kJ/mol 具有可比性。温度超

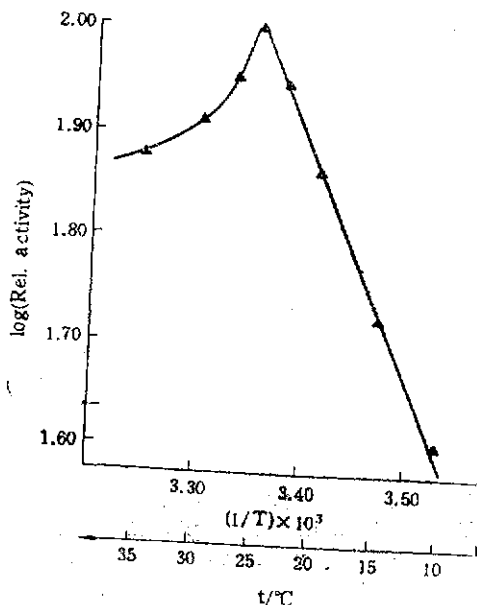


图2 反胶团中脂肪酶活力与反应温度的关系

Fig.2 Relationship between the relative activity of lipase in reverse micelles and the reaction temperature

过25°C时酶开始失活,故活力随温度升高而下降。

(四) pH的影响

脂肪酶在反胶团中的催化活力与 pH 的关系见图3。图中 pH_{i1} 指注入反胶团的初始酶缓冲液的 pH 值。由图可见,反胶团中脂肪酶在 $pH_{i1} 7.9$ 附近活力最高,这与乳液系统中脂肪酶的最适 pH 值(7.5)相比有稍许位移,可能是反胶团“水池”的特性不同于本体水的缘故,因为离子基团的电离常数与溶剂性质有关^[10]。由图还可看出,不同的缓冲液对酶活力影响不大。

(五) 最佳含水量

反胶团酶催化的一个重要特点是酶的活力依赖于反胶团的含水量,更确切地说,取决于水与表面活性剂的摩尔比, $R = [H_2O]/[表面活性剂]$ 。在 AOT 浓度恒

定的情况下,可通过调节注入反胶团的酶缓冲液的体积而改变 R 值。脂肪酶在 AOT 反胶团中的催化活力与 R 值的关系见图4。可见 R 很小时,酶活力相对较低,可能因为较大部分的酶分子直接暴露于有机溶剂中而失活的缘故。此外,水分子浓度的变化对水解反应速度也将有一定的影响。在 $R = 9.8$ 附近,酶活力最高。换言之,反胶团,反胶团脂肪酶的最适合水量为 $R \approx 10$ 。当 $R < 10$ 时酶活力随 R 增大而增加,可能与酶分子构型及“水池”性质的

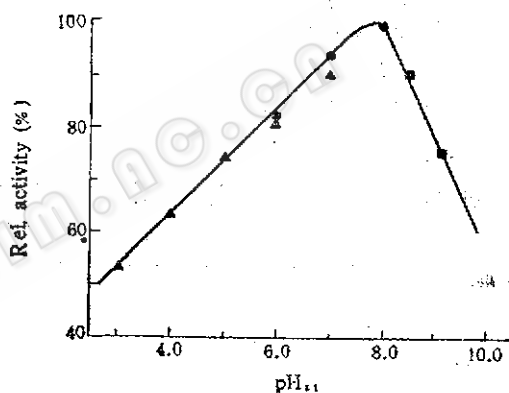


图3 pH对反胶团中脂肪酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on lipase activity in reverse micelles

- ▲ 50mmol/L 柠檬酸-磷酸盐(Citrate-phosphate)
- 50mmol/L 磷酸盐(Phosphate)
- 50mmol/L Tris-HCl

骤变^[11]有关; $R > 10$ 时酶活力随 R 增大而下降的现象,可能与“水池”水的极性增大导致底物溶解度下降有关。此外,胶团相的构型重排也是导致酶活力下降的原因之一。

(六) 米氏常数

采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,如图5所示,求得反胶团中脂肪酶的米氏常数为 $K_m = 2.3\% (v/v)$ 。实验中直至底物浓度高达50% (v/v) 时,仍未出现底物抑制现象。而在乳液系统中当底物浓

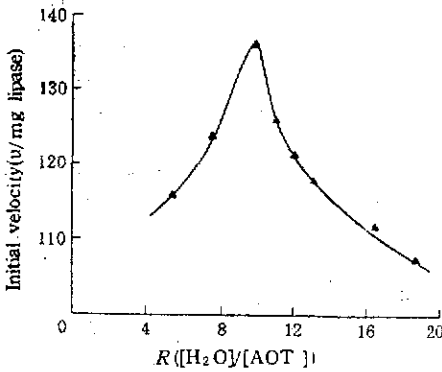


图 4 反胶团中脂肪酶的活性和水与表面活性剂摩尔比(R)的关系

Fig.4 Lipase activity in reverse micelles versus molar ratio of water to surfactant

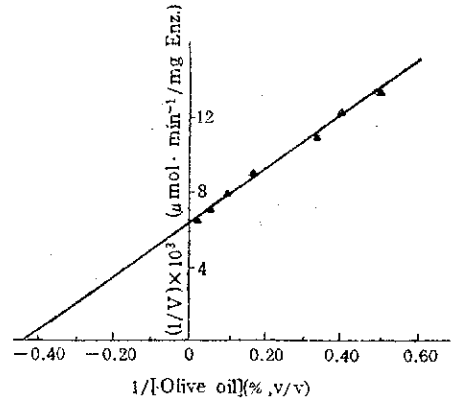


图 5 初速度与底物浓度的Lineweaver-Burk 曲线
Fig.5 Lineweaver-Burk plot of initial velocity versus substrate concentration (25℃)

度高于 3 % (v/v) 时即产生抑制^[1,2]。反胶团中的脂肪酶能在如此高的底物浓度下反应, 不仅对工业应用有重要意义, 而且为在 $[S] \gg K_m$ 的条件下用初速度法测定

脂肪酶活力提供了实际可能^[6]。

(七) 金属离子的抑制作用

表 2 金属离子的抑制效应和甘氨酸及胆盐的保护作用

Table 2 Inhibiting effect of metal ions and protecting effect of glycine and bile salt

效应子 Effector	“水池”中浓度 Concentration in water-pool (mmol/L)	相对活力 Rel. activity (%)
None	—	100
Cu(Ac) ₂	40	84.3
CoCl ₂	40	83.7
MnSO ₄	40	81.0
FeCl ₃	20	6.1
FeCl ₃	40	0
Glycine	40	100.4
Bile salt	10	96.4
CaCl ₂	80	18.2
CaCl ₂ + Bile salt	40 + 5	72.2
FeCl ₃ + Bile salt	10 + 7.5	66.1
FeCl ₃ + Glycine	20 + 20	13.2

温度: 25℃; 缓冲液: Tris-HCl, pH7.1; 橄榄油: 20% (v/v)

Temperature: 25℃; buffer: Tris-HCl, pH7.1; Olive oil: 20% (v/v)

表 2 列出了一些化合物对反胶团中脂肪酶活力的影响。由表可见, 40mmol/L 的 Cu²⁺、Co²⁺、Mn²⁺ 对酶抑制不大; 80mmol/L Ca²⁺ 的抑制较严重, 而三价 Fe³⁺ 离子几乎使酶完全失活。这可能跟金属离子与酶活性部位氨基酸残基形成螯合物有关。另一方面, 甘氨酸和低浓度的

胆盐对反胶团中脂肪酶几乎没有影响, 但是少量的胆盐可以显著减轻 Ca²⁺、Fe³⁺ 对脂肪酶的抑制。甘氨酸也有类似的作用。

(八) 脂肪酶在反胶团中的稳定性

关系反胶团脂肪酶工业应用前景的另一个重要因素是酶的稳定性问题。表征

酶的保存稳定性的一般方法是测定其残余活力。脂肪酶在不同水合度 (R) 的反胶团中的残余活力与时间的关系见图 6。可见 R 较小时酶的稳定性较好,可能因为此时反胶团“水池”较小,酶在其中的结构刚性增强的缘故。 $R=5.4$ 时于 33°C 保存 12h, 残余活力仍有 89%。如此高的稳定性给工业开发奠定了良好基础。

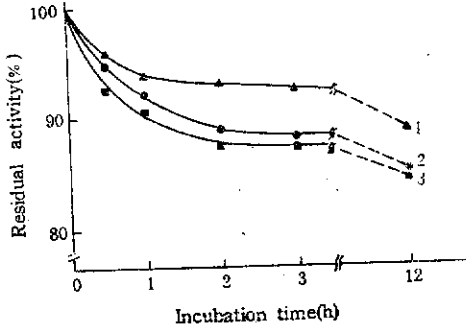


图 6 脂肪酶在反胶团中的残余活力与保温 (33°C) 时间的关系

Fig.6 Residual activity of lipase in reverse micelle versus time of incubation at 33°C

1. $R=5.4$ 2. $R=12.0$ 3. $R=16.7$

结 语

反胶团脂肪酶的研究,受到许多学者

的关注。例如,Robinson等^[8]曾系统地研究过硝基苯酚脂肪酸酯在 AOT/庚烷系统中的脂肪酶催化水解。Han 和 Rhee^[13,14]对橄榄油的催化水解进行了广泛的探讨,发现最大活力在 $R=10.5$ 处,与本文结果近似。他们还发现 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 严重抑制脂肪酶的活力。但在我们的工作中, Cu^{2+} 的抑制作用并不显著。

前已提及,在底物浓度为 10% (v/v), 温度 33°C , $\text{pH}7.1$ 及 $R=12.0$ 的条件下,脂肪酶经反胶团增溶后的活力回收率即达 60% 。假使反胶团系统的底物浓度增大到与乳液系统相等 (25% , v/v), 并在最佳条件 (25°C , $\text{pH}7.9$, $R=10$) 下反应,那么脂肪酶活力回收率还可望得到进一步提高。加之反胶团系统无需搅拌即能使底物分散均匀,并能提供脂肪酶催化所需的巨大界面^[15], 还能有效地避免底物或产物对酶的抑制。因此,反胶团方法对于开发脂肪酶在油脂工业上的应用,是一种新的有效途径。此外,由于采用反胶团系统配合比色法测定脂肪酶的活力,比起常规的乳液系统滴定法,具有稳定、灵敏、省时方便等突出优点^[6], 因此反胶团介质在生物医学分析上也将有光明的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Martinek, K. et al.; *Eur. J. Biochem.*, 155:453, 1986.
- [2] Luisi, P. L.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 24:439, 1985.
- [3] Luisi, P. L. and Laane, C.; *Trends Biotechnol.*, (6):153, 1986.
- [4] Magid, L. J. and Martin, C. A.; in "Reverse Micelles", ed. Luisi, P. L. & Straub, B. E., Plenum, New York, 1984.
- [5] Lowry, R. R. and Tinsley, I. J.; *JAOCS*, 63:470, 1976.
- [6] 许建和等; 工业生化杂志, (2), 1991(待印)。
- [7] 朱俭等; 生物化学实验, 上海科技出版社, 1981。
- [8] Fletcher, P. D.I. and Robinson, B. H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 81:2667, 1985.
- [9] Desnuelle, P.; *Adv. Enzymol.*, 23:129, 1961.
- [10] Menger, F. M. and Saito, G.; *J. Am. Chem. Soc.*, 100:4376, 1978.
- [11] Wong, M. et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, 98:2391, 1976.
- [12] Celebi, S. S. et al.; in "Advances in Biotechnology", Vol. 1, ed. Moo-young M., Pergamon Press, Toronto, 1981.
- [13] Han, D. and Rhee, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.*, 28:1250, 1986.
- [14] Han, D. and Rhee, J. S.; *Biotechnol. Bioeng.*, 30:381, 1987.
- [15] Desnuelle, P.; in "The Enzymes", ed. Boyer, P. D., Academic Press, 1972.

Study on the Catalytic Performance of Lipase in Reverse Micelles

Xu Jianhe Mao Qingcheng Ying Xugen Hu Ying

(Thermodynamics Laboratory, East China University of Chemical Technology, Shanghai)

The hydrolysis of olive oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase solubilized in "H₂O/AOT/isooctane" reverse micellar solution has been studied. The optimal conditions observed for lipase in reverse micelles are $t = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}_{\text{opt}} = 7.9$ and $R = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 10$. Lipase in reverse micelles is found to be quite stable. For example, after incubating at 33°C for 12 h in AOT/isooctane with $R = 5.4$, the residual activity of lipase remains as high as 89%. No inhibition has been found as the substrate concentration increased up to 50% (v/v), and only a little inhibition occurs when 40 mmol/L Cu^{2+} , Co^{2+} and Mn^{2+} exist in water pools.

Key words

Reverse micelles; lipase; catalytic performance.