

# 由扩展青霉产生碱性脂肪酶的纯化及其特性

施巧琴\*      鹿育晋

(山西省生物研究所,太原)

国外报道了不少由细菌<sup>[1]</sup>、霉菌<sup>[2]</sup>、酶母菌产生的中性脂肪酶及由细菌<sup>[3]</sup>产生的碱性脂肪酶的纯化方法,国内尚未见有关脂肪酶纯化的报道。为了进一步研究和扩大该酶在医药、食品等方面的应用范围,我们对由扩展青霉突变株 UN-503 产生的碱性脂肪酶进行了纯化及其特性的研究,现报道如下。

## 材 料 和 方 法

### (一) 材料

#### 1. 扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 突变

---

\* 现在工作单位: 福建师范大学生物系。

株 UN-503 的发酵液<sup>[4]</sup>。

2. Sephadex G-200 (德国产)。

3. DEAE32-纤维素(Whatman 进口分装)。

4. 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (成都化学试剂厂)。

5. 凝胶过滤柱  $20 \times 4\text{cm}$  (中国科学院上海生物化学研究所制)

## (二) 方法

1. 碱性脂肪酶活性测定: 用 NaOH 滴定法<sup>[4]</sup>。做酶对不同底物的水解试验时, 为使动物油中的羊油、猪油能充分水解, 以油脂 1g、4% PVA2ml (pH9.2)、甘氨酸缓冲液 6ml (pH9.2), 于  $35^{\circ}\text{C}$  水浴预热 15 分钟, 加入 1ml 酶液, 立即移至  $35^{\circ}\text{C}$ , 220rpm 振荡 8 小时, 取下加入酒精: 丙酮(1:1) 混合液 20ml。再置于  $55^{\circ}\text{C}$  水浴 20 分钟, 用 0.05N NaOH 滴定。

2. 蛋白质的测定: 用 Folin 法, 72 型分光光度计测定。

## 结果与讨论

### (一) 碱性脂肪酶的纯化

取 UIV-503 变株发酵液经过滤, 用饱和度为 35% 的硫酸铵沉淀、置  $5^{\circ}\text{C}$  静止 24 小时, 离心弃去上清液, 沉淀干燥后的粗酶粉, 其活力为 6100u/g。加约 4 倍蒸馏水, 于低温自来水透析一天, 继续用 0.01M pH9.2 tris 缓冲液透析一天, 离心后, 上清液用逆透析法浓缩。

将浓缩的酶液加入到事先用 0.01M tris 缓冲液平衡了的 DEAE 纤维素柱内, 吸附脂肪酶, 用同一浓度缓冲液洗柱。然后用 tris 缓冲液配成 0.1—0.5M NaCl 的梯度溶液, 由低到高缓慢加入, 流速 50ml/小时, 使吸着的脂肪酶洗脱下来。收集并测定活性区。经测定, 用 0.2M NaCl 溶液则可全部洗脱下来。活性区溶液用聚乙二醇逆透析法浓缩 (图 1)。

SephadexG-200 过滤: 用 0.01M tris pH9.2 缓冲液平衡, 将以上浓缩液加入到柱中, 并用同一浓度缓冲液冲洗、流速 20ml/h 收集活性区、再用 tris 缓冲液在低温下进行透析 24 小时, 浓

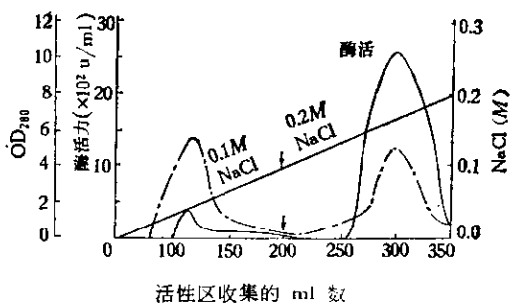


图1 DEAE 32-纤维素柱洗脱

缩干燥 (图 2), 得到白色粉末。经纯化后酶的

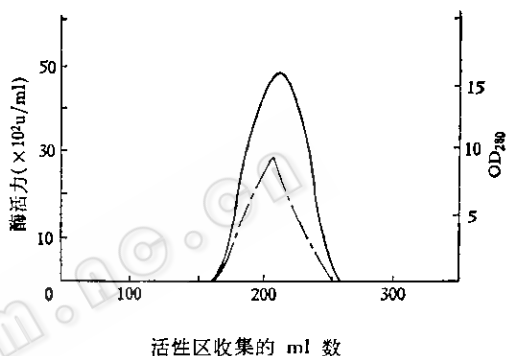


图2 经浓缩干燥、纯化后的酶的比活力

比活力是 2184u/OD<sub>280</sub>, 回收率为 22.8%, 纯化倍数达 168 倍。

### (二) 碱性脂肪酶的酶学特性

1. 酶作用最适温度: 在  $25-55^{\circ}\text{C}$  的不同温度下测定同一酶液的活性。结果表明, 该酶在  $33^{\circ}\text{C}$  时酶活力最高。

2. 酶的热稳定性: 取稀释后的酶液于不同温度下处理, 每隔 20 分钟取样, 于冷水浴中迅速

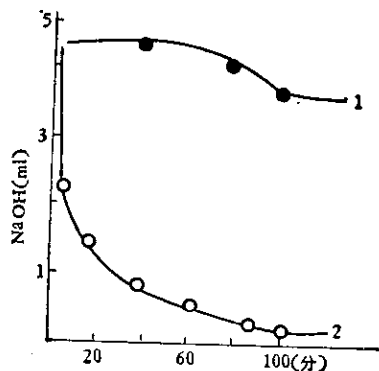


图3 酶的热稳定性

1.  $35^{\circ}\text{C}$ , 2.  $40^{\circ}\text{C}$

冷却,测定残余酶活力。由图3所示,该酶在35℃60分钟保持稳定。100分钟基本稳定。40分钟严重失活。

3. 酶作用最适 pH: 用如下各种不同缓冲液代替滴定法中 0.05M 甘氨酸缓冲液。橄榄油乳化液也用相应的缓冲液配制。pH5 缓冲液用 0.1M 柠檬酸和 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH6—8 用 0.05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 0.05M  $\text{NaOH}$ ; pH9—12 用 0.05M 甘氨酸缓冲液配制。实验结果表明,该酶最适作用 pH 为 9.3。

4. 酶对不同 pH 的稳定性: 取酶液 2ml 加

等量的各种不同 pH 缓冲液,置 5℃ 冰箱 24 小时,用 0.1M pH9.4 甘氨酸缓冲液测定酶活力,结果此酶在 pH7.0—9.5 之间最稳定。

5. 酶作用时间: 在温度为 35℃、pH9.4 的甘氨酸缓冲液中,测定不同作用时间的样品。实验表明此酶作用 15 分钟后,随时间增加反应速度逐渐减缓。

6. 酶对不同底物的水解作用: 取各种不同底物分别加入到 250ml 三角瓶内,按上述的方法测定。结果如表 1 所示,该酶对各种底物的水解作用不同,其中植物油中对玉米油水解作

表 1 酶对各种底物的水解作用

| 底物种类         | 橄榄油  | 蓖麻油  | 大豆油  | 猪油   | 羊油   | 吐温 80 | 甘油三丁酸脂 | 玉米油  |
|--------------|------|------|------|------|------|-------|--------|------|
| 酶活性 (NaOHml) | 29.2 | 37.8 | 37.0 | 32.8 | 27.6 | 22.2  | 26.4   | 45.4 |

用最强,动物油中以猪油较好。

7. 酶的抑制剂: 将酶液与各种抑制剂混合,使测试液中抑制剂的最后浓度为  $1 \times 10^{-3}M$ ,按

表 2 金属离子对酶活力的影响

| 金属盐                          | 金属离子浓度 (M)         | 酶活力 (NaOH ml) |
|------------------------------|--------------------|---------------|
| $\text{CaCl}_2$              | $1 \times 10^{-2}$ | 10.65         |
|                              | $4 \times 10^{-3}$ | 13.50         |
| $\text{FeSO}_4$              | $1 \times 10^{-3}$ | 10.90         |
| $\text{FeCl}_3$              | $1 \times 10^{-3}$ | 10.25         |
| $\text{CuSO}_4$              | $1 \times 10^{-3}$ | 9.90          |
| $\text{K}_2\text{CrO}_7$     | $1 \times 10^{-3}$ | 10.00         |
| $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ | $1 \times 10^1$    | 9.80          |
| $\text{ZnSO}_4$              | $1 \times 10^1$    | 9.70          |
| CK                           | 0                  | 10.50         |

上述 NaOH 滴定法进行测定。结果除甲苯以外的过氧化氢、高锰酸钾、8-羟基奎林、谷胱甘肽、碘等均对该酶有抑制作用。

8. 金属离子对酶活性的影响: 将酶液与各种金属离子混合,使测试液中金属离子最后浓度为  $1 \times 10^{-3}M$ ,设不加金属离子的为对照,按上述 NaOH 滴定法进行测定。如表 2 所示,  $\text{Ca}^{2+}$  对该酶有激活作用,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  作用不明显  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  等对该酶有抑制作用。

## 参 考 文 献

- [1] Sugiura, M. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **38**(5): 947, 1974.
- [2] Yoshio Tsujisaka et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **37**(6): 1457, 1973.
- [3] 国生纯孝等,公开特许公报,特开昭 53-19093 1978.
- [4] 施巧琴: 微生物学通报, **8**(3): 108—110, 1981.