

嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的酶学性质研究

王武^{1,2}, 唐晓明¹, 付敏¹, 潘见^{2,*}

(1.合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009;

2.农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 本实验对嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的酶学性质进行了研究。结果表明: 以亚油酸为底物, 亚油酸异构酶的最适反应温度为 40℃; 最适反应 pH 值为 4.0, pH 值在 3.0~6.0 范围内有较高的稳定性; 不同的金属离子和有机试剂对亚油酸异构酶的影响程度不同, 同一种金属离子和有机试剂在不同浓度下也不相同; 以亚油酸为底物的酶促反应米氏常数 $K_m=33.33\text{mol/L}$, $V_{\max}=15.6\text{mol/L}\cdot\text{h}$ 。

关键词: 嗜酸乳杆菌; 亚油酸异构酶; 酶学性质

Study on Enzymological Properties of Linoleic Acid Isomerase from *Lactobacillus acidophilus*

WANG Wu^{1,2}, TANG Xiao-ming¹, FU Min¹, PAN Jian^{2,*}

(1.School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology ,Hefei 230009, China;

2.Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei 230009, China)

Abstract: The lionleic acid ismerase from *Lactobacillus acidophilus* was extracted to study its enzymological properties. The results indicated that the optimum temperature and pH value of lionleic acid ismerase are 40 °C and 4 respectively, and the ismerase exhibits strong stability to temperture (20 ~50 °C) and pH value (4.0~6.0) for 1 h. Various metal ions and their respective concentrations have various effects on activity of the ismerase, and organic solvent as well. The K_m of the ismerase is 33.33 mmol/L, and the V_{\max} is 15.6 mmol/L · h.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*; lionleic acid ismerase; enzymological properties

中图分类号: Q946.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0243-04

共轭亚油酸(conjugated linoleic acid, 简称 CLA)是一系列在 C9、11 或 C10、12 位具有双键的亚油酸(linoleic acid, 简称 LA)的位置和几何异构体的总称^[1]。研究发现, CLA 具有抑制肿瘤^[2-3], 抗动脉粥样硬化^[4], 抗氧化等生理功能, 在食品医药领域具有诱人的应用前景。目前获取 CLA 的方法主要有化学合成法和生物合成法^[5], 化学合成法产率较高, 但产物往往是多种异构体的混合物, 且含环化副产物, 难以分离, 制约了其在食品医药领域的应用; 生物合成法则是利用亚油酸异构酶将 LA 转化为高活性的 c9,t11-18:2 和(或)t10,c12-18:2 CLA, 应用前景广阔。

亚油酸异构酶^[6-9]是微生物细胞在培养液中存在 LA 诱导的前提下, 于菌体内生成的一种胞内酶, 它只作用于具有 cis9, cis12-18:2 二烯结构且羧基游离的脂肪酸, 该酶可以通过细胞形式催化 LA 转化为 CLA, 也可以通过分离出的膜形式进行反应; 不同菌体产生的亚油

酸异构酶往往不同, 相应地可生成不同的 CLA 异构体, 目前发现可用来诱导产酶的微生物主要有溶纤维丁酸弧菌、丙酸菌和乳酸菌等。受底物 LA 对细胞生长抑制的影响, 采取细胞形式转化生产 CLA 存在局限性, 选择亚油酸异构酶进行异构化反应是工业化应用的必然趋势。本实验以嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶为研究对象, 在分离纯化的基础上探索其酶学性质, 为利用微生物酶法工业化生产活性 CLA 提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 亚油酸异构酶制备工艺

菌种(*Lactobacillus acidophilus* 1.1854)→活化、细胞培养、收集、破碎→硫酸铵盐析→粗酶液(比活力 290.0U/mg, 冷藏, 用于性质研究)→透析→亚油酸异构

收稿日期: 2007-08-15

作者简介: 王武(1968-), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为农产品生物化工。E-mail: ww68@163.com

* 通讯作者, 潘见(1955-), 男, 教授, 研究方向为农产品加工及贮藏工程。E-mail: panxie163@163.com

酶(比活力 307.95U/mg, 冷藏, 用于动力学参数测定)

1.1.2 试剂

共轭亚油酸(99%)、亚油酸(60%) Sigma 公司; 硫酸钠、正己烷、三氯化铁、三氯乙酸、牛血清白蛋白 BSA、磷酸氢二钠、柠檬酸、过硫酸铵、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、氯化钙、氯化锌、硫酸亚铁、硫酸铜、 $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、氯化铁、十二烷基硫酸钠(SDS)及脲, 以上均为分析纯(AR)。

1.1.3 设备

DNP-9162 型电热恒温培养箱 上海一恒科技有限公司; SHY-21 水浴恒温振荡器 上海精宏实验设备有限公司; UV-1600 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; JY92-II 超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.2 共轭亚油酸的检测

采用紫外分光光度法^[10-11]。制作吸光度 A_{233nm} 与 CLA 浓度关系的标准曲线, 根据吸光度 A_{233nm} 计算 CLA 浓度。

1.3 酶活力的测定

选比色测定法^[11]测定亚油酸异构酶的酶活力。1h 内生成 $1\mu g$ CLA 所需要的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{酶活力(U/ml)} = \frac{K \times G}{V \times T}$$

式中, K 为酶液稀释倍数; G 为所生成的共轭亚油酸量(μg); V 为吸取酶液体积(测定时取 0.2ml); T 为反应时间(h)。

1.4 亚油酸异构酶的理化性质研究

先配制亚油酸底物溶液。称取纯度为 60% 亚油酸 143mg, 加入牛血清白蛋白(BSA)20mg 和 100ml, pH4.0 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲液, 在冰水浴中进行超声波乳化处理(超声功率 400W, 工作 5s, 间歇时间 10s, 超声 40 次)。

1.4.1 亚油酸异构酶的最适反应温度的确定

移取 2ml 的亚油酸底物溶液于洁净的试管中, 将试管分别放置于 20、30、40、50、60、70、80℃, 加入 0.2ml 适当稀释的酶液, 1h 后测定酶活力, 平行测定三次取均值。

1.4.2 亚油酸异构酶的热稳定性研究

各取 2ml 酶液分别在 20、30、40、50、60、70、80℃放置 1h 后, 用冰浴迅速冷却至室温, 然后在 40℃下测定酶活力, 平行测定三次取均值。

1.4.3 亚油酸异构酶的最适 pH 值的确定

配制 pH 值从 2.0~9.0 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲溶

液。然后分别用不同 pH 值的缓冲溶液配制亚油酸底物溶液, 超声乳化, 在 40℃下测定酶活力, 平行测定三次取均值。

1.4.4 亚油酸异构酶的酸碱稳定性研究

将酶液置于等体积、不同 pH 值(pH2.0~pH9.0)的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲溶液中保持 1h, 然后置于 pH4.0 磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲溶液、40℃条件下测定酶活力, 平行测定三次取均值。

1.4.5 金属离子对亚油酸异构酶活力的影响

分别向酶液中添加不同浓度的金属盐溶液 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} , 使金属离子的终浓度分别为 0.01、0.002mol/L, 以不添加任何金属离子的酶液作为对照组, 在 40℃下保温 3h 后, 测定酶活力。

1.4.6 有机试剂对亚油酸异构酶活力的影响

将不同浓度的有机试剂脲、SDS、牛血清白蛋白与酶液等量混合, 以不添加任何有机试剂的酶液作为对照组, 其中脲和 SDS 终浓度为 0.01、0.002mol/L, 牛血清白蛋白终浓度为 1、0.2mg/ml, 在 40℃下保温 3h 后测定酶活力。

1.4.7 亚油酸异构酶的动力学参数的测定

配制 2%、4%、6%、8%、10%、12% 浓度的亚油酸底物溶液, 于 pH4.0 的磷酸氢二钠 - 柠檬酸缓冲溶液中进行超声乳化, 加入酶液后测定其酶活力及产物 CLA 的生成量, 反应速度以每小时产生的共轭亚油酸浓度计(mmol/L·h)。用 LineWeaver-Burk 双倒数作图法作图, 求取米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 。

2 结果与分析

2.1 亚油酸异构酶的最适反应温度

如图 1 所示, 亚油酸异构酶的最适反应温度在 40℃左右。20~40℃范围内, 随着温度的升高, 酶活力迅速上升。当反应温度超过 40℃时酶活力开始下降, 持续升高温度, 酶活力将不断减小直到酶变性失活。

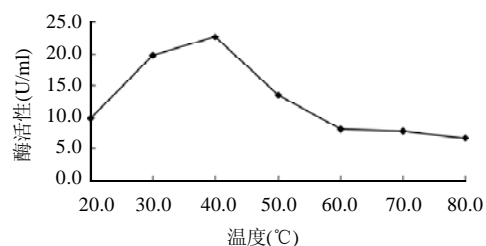


图 1 温度对亚油酸异构酶活性的影响

Fig.1 Effects of temperature on activity of linoleic acid isomerase

2.2 亚油酸异构酶的热稳定性

如图2所示,随着温度升高,酶的稳定性逐渐下降,酶在40℃以下具有较好的稳定性。当温度高于40℃时,酶活力直线下降,残存酶活力由40℃时的95%下降到80℃时的19%左右。可见亚油酸异构酶是一种耐热性较差的酶,保存时需控制环境温度以防止酶活力下降。

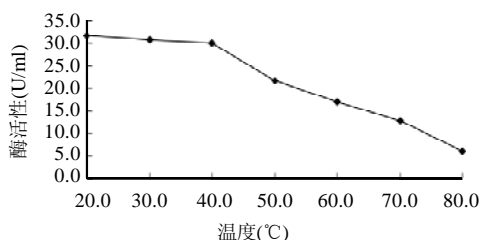


图2 温度对亚油酸异构酶稳定性的影响

Fig.2 Effects of temperature on stability of linoleic acid isomerase

2.3 亚油酸异构酶的最适反应 pH 值

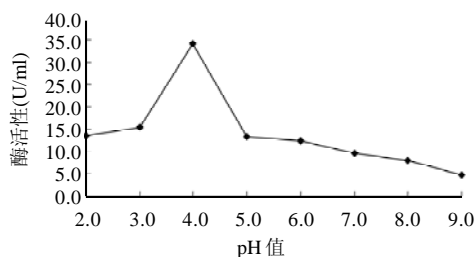


图3 pH值对亚油酸异构酶活性的影响

Fig.3 Effects pH on activity of linoleic acid isomerase

如图3所示,亚油酸异构酶的最适反应pH值为4.0左右,pH值在3.0~5.0范围内酶具有较大的酶活力。pH值越低或越高,酶活力的下降程度越为严重。

2.4 亚油酸异构酶的酸碱稳定性

如图4所示,亚油酸异构酶在pH3.0~6.0时较稳定,在pH大于7.0或小于3.0时,酶活力迅速下降。其主要原因在于过酸或过碱的环境将可能使酶的构象发

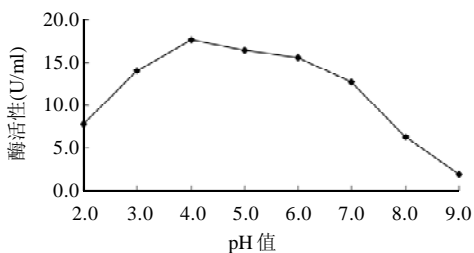


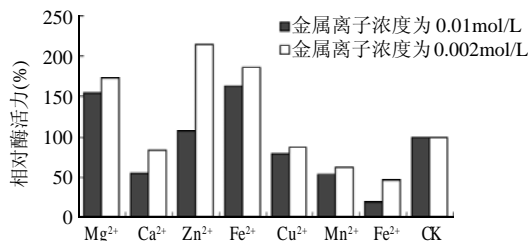
图4 pH值对亚油酸稳定性的影响

Fig.4 Effects of pH on stability of linoleic acid isomerase

生变化,使酶发生不可逆变性。酸碱稳定性也表明,该酶在偏酸性环境中具有较好的活性,这也为该酶在偏酸性的非水相反应体系中应用提供了可能。

2.5 金属离子对亚油酸异构酶活性的影响

如图5所示,对于同种金属离子而言,金属离子的浓度低时($2.0 \times 10^{-3} \text{mol/L}$)的亚油酸异构酶的活性比金属离子浓度高时($1.0 \times 10^{-2} \text{mol/L}$)的酶活性要大。与不添加金属离子的对照组相比, Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对亚油酸异构酶具有促进作用,促进作用大小为: $\text{Fe}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$,而 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 对其有抑制作用,抑制作用的大小为: $\text{Fe}^{3+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$,这也是测定亚油酸异构酶活力时采用具有 FeCl_3 的三氯乙酸作为其反应终止液的原因。



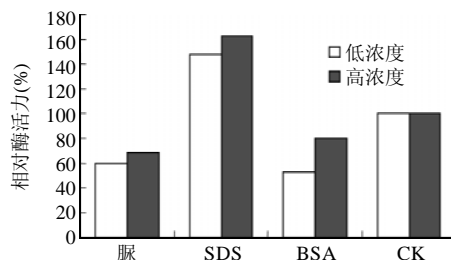
以不添加任何金属离子的酶液相对酶活力为100%。

图5 金属离子对亚油酸异构酶的影响

Fig.5 Effects of metal ion on activity of linoleic acid isomerase

2.6 有机试剂对亚油酸异构酶活性的影响

如图6所示,对于每种有机试剂而言,有机试剂浓度小时,亚油酸异构酶的活力比浓度高时的酶活力要高;从表中还可以看出,SDS试剂对亚油酸异构酶有促进作用,脲和牛血清白蛋白对亚油酸异构酶有抑制作用。



以不添加任何有机试剂的酶液相对酶活力为100%。

图6 有机试剂对亚油酸异构酶的影响

Fig.6 Effects of organic solvent on activity of linoleic acid isomerase

2.7 亚油酸异构酶的动力学参数

采用Lineweaver Burk作图法作图,结果如图7所示。根据回归方程,可以求得嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的 K_m 为 33.33mmol/L ,其最大反应速度 V_{max} 为 $15.6 \text{mmol/L} \cdot \text{h}$ 。

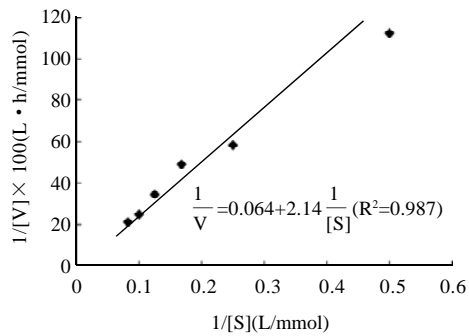


图7 亚油酸异构酶的动力学参数曲线

Fig.7 Dynamic curve of linoleic acid isomerase

3 结论

综上所述,嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶的最适反应温度为 40°C ,酶在 40°C 以下具有较好的热稳定性;酶的最适反应pH值为4.0,pH值在3.0~6.0范围内,亚油酸异构酶具有较大的活力;金属离子 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{2+} 对亚油酸异构酶具有促进作用, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 对其有抑制作用;有机试剂SDS对亚油酸异构酶有促进作用,脲和牛血清白蛋白对亚油酸异构酶有抑制作用;以亚油酸为底物酶促反应的米氏常数 $K_m=33.33\text{mmol/L}$, $V_{\max}=15.6\text{mmol/L} \cdot \text{h}$ 。

目前,利用亚油酸异构酶合成共轭亚油酸的反应以水溶性反应体系为主,乳化剂的加入增加了底物亚油酸与酶的接触机会,但没能改变体系中底物溶解少、反应过程中产物得率低、产物稳定性差以及反应后酶的分回收困难等局面。若能找到一种反应体系,它能有

利于底物溶解、有利于酶促反应的进行、有利于产物稳定、有利于产物与酶的分离,情形会改善许多,超临界二氧化碳正是这样一种期望的非水相反应体系,偏酸性的环境、接近 40°C 的低温、以及 $7\sim 50\text{MPa}$ 的低压都预示着嗜酸乳杆菌亚油酸异构酶在此体系下具有很好的适应性,应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 王月囡,曹键,曾实,等.共轭亚油酸生物合成的研究[J].食品研究与开发,2006,27(4):4-8.
- [2] MAJUMDER B, WAHLE K W J, MOIR S, et al. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells[J]. FASEB, 2002, 16:1447-1449.
- [3] HAN J C, WOO K K, EUN J K, et al. Conjugated linoleic acid inhibits cell proliferation and ErbB3 signaling in HT-29 human colon cell line [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284: 996-1005.
- [4] 范亚苇,邓泽元,刘蓉,等.共轭亚油酸对动脉粥样硬化老龄大鼠血脂和血浆脂肪酸的影响[J].营养学报,2006,28(6):474-474.
- [5] 曹莹,杨林,陈振宇,等.共轭亚油酸的合成、分析和氧化稳定性[J].化学通报,2004(4):257-265.
- [6] 冯有胜,丁红梅.共轭亚油酸的结构与性质[J].中国粮油学报,2005,20(4):93-96.
- [7] 张浩,曹键,常共宇,等.亚油酸异构酶研究进展[J].中国油脂,2004,29(10):38-42.
- [8] 熊向峰,陈朝银,赵声兰.亚油酸异构酶及其性质[J].工业微生物,2002,32(4):51-54.
- [9] PAIZA M W, YANG X Y. Method of producing conjugated fatty acids: US, 5856149[P]. 1999-01.
- [10] 薛秀恒,王志耕,王菊花,等.牛奶中共轭亚油酸含量的紫外分光光度测定方法[J].食品工业科技,2005(7):176-178.
- [11] 苗士达,张中义,刘萍,等.植物乳杆菌亚油酸异构酶的分离纯化及性质研究[J].食品与发酵工业,2005,31(3):12-15.