脂肪酶的失活动力学与疏水特性研究

邢建宇, 杨建军

(长安大学 环境科学与工程学院, 陕西 西安 710054)

摘 要: 在不同温度下考察脂肪酶的失活动力学, 并将失活率不同的脂肪酶使用疏水层析色谱进行分析, 查看其保留行为。结果表明, 设定 40 e 时的酶活为 100%, 则酶活为 0~ 100% 在疏水层析柱上表现为 2. 16~ 2. 39 m in的保留时间区间。但是在该保留时间区间内, 脂肪酶的热失活引起的结构变化, 在疏水柱上的保留时间并不呈线性变化, 使用 Z 值查看脂肪酶与固定相的结合情况, 表明 Z 值的变化与脂肪酶失活情况下的结构变化不存在明显的对应关系。

关键词: 脂肪酶; 失活动力学; 疏水层析

中图分类号: Q 556 文献标识码: A 文章编号: 1671- 3206(2010) 05- 0710- 03

Investigation on the deactivation kinetics and hydrophobic properties of lipase

XING Jian2yu, YANG Jian2jun

(School of Environmental Science and Engineering, Chang an University, Xi an 710054, China)

Abstract Deactivation kinetics of lipase was investigated under different temperature. Lipases with differ2 ent inactivation rate were analyzed by hydrophobic interaction chromatography and retention behavior was studied. Results show that lipase activity of 0 ~ 100% would caused a retention time interval of 2. 16~ 2. 39 m in when defined lipase activity at 40 e as 100%. In this time interval, structural change caused by heat inactivation and retention time of it was not changes in linear way. When interaction of li2 pase and stationary phase was investigated by Z value, there was no corresponding relationship between changes of Z and inactivation of lipase observed.

Key words: lipase; deactivation kinetics; hydrophobic interaction chromatography

多数的酶都是蛋白质, 蛋白质对于温度非常敏感, 温度过高, 会引起蛋白质的结构发生变化, 作为酶来说, 其活性部位结构的改变会引起酶的失活, 在这一过程中, 往往会伴随着疏水基团的暴露, 其溶解性也会降低。疏水层析 (HIC)是根据分子表面疏水性差别来分离蛋白质和多肽等生物大分子的一种较为常用的方法, 分子表面疏水基团越多, 则在疏水层析柱上该分子的保留时间就越长[1]。陈国亮等人的研究发现, 疏水柱中蛋白质保留值的增加是由构象变化而不是由盐析和动力学因素引起的[2]。所以, 疏水层析柱上酶的保留时间可以反映出其疏水基团的暴露程度, 进而能够反映其失活程度。本文通过对脂肪酶的失活动力学进行研究, 将其失活行为与其在疏水层析柱中的保留行为相关联, 初步探索两者之间的联系。

1 实验部分

1. 1 试剂与仪器

脂肪酶, 工业品; 磷酸、氢氧化钠、Na_2HPO_4、NaH_2PO_4、$(NH_4)_2SO_4$均为分析纯。

Toyopearl SuperButyl2550型疏水层析柱; LC2 2010A型高效液相色谱仪。

1. 2 脂肪酶的失活实验

称取酶粉 5 g 先以少量磷酸缓冲液溶解, 并用玻璃棒捣研, 将上清液小心倾入容量瓶中, 沉渣部分再加入少量缓冲液, 如此反复捣研, 最后全部移入容量瓶中, 用缓冲液定容至刻度, 摇匀。转入组织捣碎机捣研 3 m in, 在不同温度下, 热处理 1 h, 测定残余酶活, 并取样进行疏水层析分析。

1. 3 脂肪酶酶活的测定

采用氢氧化钠滴定法测酶活[3]。在 40 e 、pH 9. 4的条件下, 每分钟催化水解底物产生 1 Lmol游离脂肪酸的酶量定义为一个脂肪酶国际单位。

1. 4 脂肪酶的疏水层析

采用疏水层析柱, 用平衡缓冲液 [25 mmol/L Na_2HPO_4/NaH_2PO_4, 1. 0 mol/L $(NH_4)_2SO_4$, pH 7. 0] 进行平衡, 至基线平稳, 上样体积 50 LL约 80 Lg 控制柱温 25 e 。以水的负峰测定死时间 t_0, 在色谱图

收稿日期: 2010203209 修改稿日期: 2010203222

作者简介: 邢建宇 (1979-), 男, 陕西户县人, 长安大学讲师, 硕士, 从事生物工程相关研究。电话: 13709210612, E- mail xingjy@ chd. edu. cn.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

上读出脂肪酶的保留时间 t_R, 并按照公式 $k' = (t_R - t_0)/t_0$ 计算不同温度下处理后脂肪酶在疏水层析柱容量因子。

1.5　溶质计量置换保留模型

蛋白质在 HIC 中的保留是遵从计量置换保留模型 (简写为 SDM2R) 且置换剂为水[4]。有如式 (1)的数学表达式。

$$\lg k' = \lg I - Z \lg[H_2O] \quad (1)$$

式中, k'为容量因子; Z 表示从流动相中吸附 1 mol 蛋白质到配体上时, 在固定相及蛋白质接触的表面处失去水分子的摩尔数; lgI为反映蛋白质与配体间亲和势的一个参数, $[H_2O]$为水的摩尔浓度, 可参考 Feng等人的测定方法测得[5]。

当流动相中盐浓度大于 0.5 mol/L时, lgI和 Z 为两个常数, 所以式 (1)为一线性方程式。Z 和 lgI 分别为 $\lg k'$对 $\lg[H_2O]$线性作图的斜率与截距。可分别求出 Z 和 lgI。

2　结果与讨论

2.1　热失活

将脂肪酶在不同温度下热处理 1 h, 在 pH 7.5 处测定残余酶活, 见图 1。

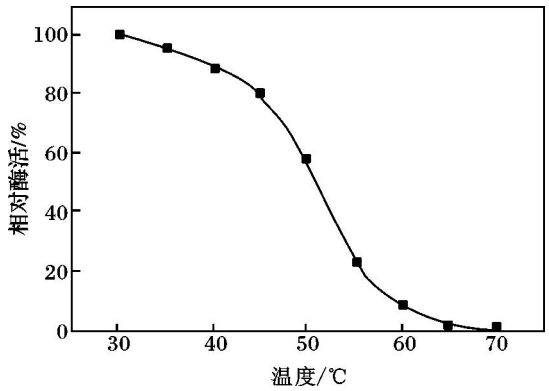

图 1　脂肪酶的热稳定性测定

Fig 1　Thermo2stability analysis of lipase

在一定温度下, 脂肪酶的热失活速率可以表示为: $\frac{de_t}{dt} = -K_d e_t + K_r[e_d]$

式中　K_d))) 失活反应速率常数, h^{-1};

K_r))) 复活反应速率常数数, h^{-1};

e_t))) 保温时间 t时的脂肪酶活性;

e_d))) 保温时间 t时的脂肪酶变性失去的活性。

假设脂肪酶的变性过程不可逆, 则 $K_r = 0$, 则 $\frac{de_t}{e_t} = -K_d dt$, 积分可得 $\ln\frac{e_t}{e_0} = -K_d t + C$。基于图 1 的结果, 可计算脂肪酶的热失活常数 K_d。我们认为, 酶活的损失在一定温度范围内是随时间呈直线下降的, 基于此认识, 结合图 1的结果, 可知半衰期 $t_{1/2}$, 从而根据 $\ln 2 = K_d \# t_{1/2}$, 求得 K_d, 见表 1。

表 1　脂肪酶在不同温度下的热失活情况

Table 1　Inactivation of lipase at different temperatures

温度 /e	K_d/h^{-1}	$t_{1/2}$ /h
40	0.38	1.82
50	0.61	1.14
60	4.33	0.16

从热失活反应速率常数 K_d 可以看出, 在温度为 40 e 和 50 e 时, K_d变化并不是特别明显, 但是当温度为 60 e 时, K_d从 40 e 的 0.61增加到 4.33, 相应的半衰期也急剧下降。

2.2　疏水层析分析

将脂肪酶在 40, 50, 60 e 下处理 1 h, 并进行疏水层析, 见图 2。

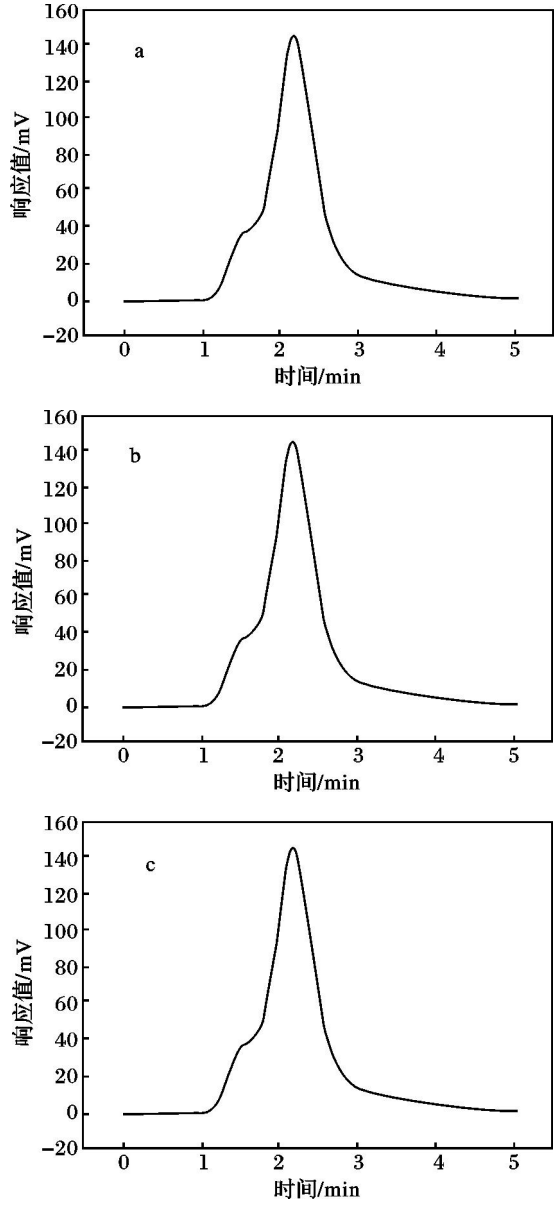

图 2　脂肪酶的疏水层析色谱图

Fig 2　Hydrophobic interaction chromatography of lipase

a 40 e; b. 50 e; c 60 e

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

脂肪酶在疏水柱上表现出不同的保留行为,主要体现在保留时间的增加,见表 2。

表 2 脂肪酶在疏水层析柱上的保留行为

Table 2 Retention behavior of lipase on SuperButyl2550

温度 /e	保留时间 /min	Z 值
40	2.16	21.3
50	2.24	28.1
60	2.39	31.2

脂肪酶基本组成单位仅为氨基酸,通常只有一条多肽链,它的催化活性仅仅决定于它的蛋白质结构。蛋白质分子在天然状态下都有一个特殊的三级或四级结构,且蛋白质表面大多数为亲水性的氨基酸残基,而分子内部则主要为疏水性的氨基酸残基。在较高温度下热处理一段时间后,其分子内部的疏水键被破坏,从而使包藏在分子内部的疏水性氨基酸残基更多地暴露出来,结果使脂肪酶分子与固定相之间的接触面积发生变化,这种接触表面面积的变化自然导致了 Z 值的变化,即在固定相及脂肪酶接触的表面处失去水分子发生了变化。脂肪酶在分子构象变化的程度应与热处理的强度有关。从表观上来看,高温下处理后脂肪酶在疏水层析柱上的保留时间增加得更明显一些。

2.3 酶的失活与疏水层析柱中的保留行为

在较高温度的处理下,脂肪酶分子的立体结构发生改变,当温度的处理导致分子内部氨基酸残基的外露时,在使用疏水层析进行分析时,可以和固定相之间发生疏水部位接触的面积就会变大,则 Z值变大,从而导致脂肪酶在进行疏水层析时保留时间的延长,但是当更多疏水基团外露,脂肪酶与固定相之间的接触只使用其中疏水性较强的表面即可,这样使得脂肪酶与固定相接触的牢靠程度并不取决于接触表面的面积,如表 2所示,虽然随着失活程度的加重,Z 值逐渐增加,但是 Z值的变化并不呈简单的线性关系。

3 结论

(1)游离脂肪酶的最适反应温度为 40 e ,设定 40 e 时的酶活为 100%,当酶完全失活的时候,酶活为 0,则在疏水层析柱上表现为 2.16~2.39 min的保留时间区间。

(2)脂肪酶的热失活引起的结构变化,在疏水柱上的保留行为并不呈线性变化,即并不能通过保留时间线性的反映脂肪酶的结构变化,即酶的活性残留状况。

(3)Z 值的变化能够初步反映固定相与脂肪酶之间的结合情况,但是 Z 值的变化与脂肪酶的失活情况不存在明显的对应关系。

参考文献:

[1] Queiroz J A, Tomaz C T, Cabral J M S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 87(2): 143-159.

[2] 陈国亮,李华儒. 蛋白质在疏水色谱中的热行为[J]. 色谱, 1996, 14(3): 172-175.

[3] Watanabae N, Oat Y, Minoda Y, et al. Studies on alkaline lipase from pseudomonas species Part I. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes[J]. Agr Biol Chem, 1977, 41(8): 1353-1358.

[4] Geng X D, Guo L, Chang J H. Study of the retention mechanism of proteins in hydrophobic interaction chromatography[J]. Journal of Chromatography, 1990, 507(16): 1-23.

[5] Feng W K, Jiang X Q, Geng X D. The influence of urea on the retention of protein in hydrophobic interaction chromatography[J]. Journal of Liquid Chromatography, 1995, 18(2): 217-226.

(上接第 709页)

[3] Bernardo E C, Egashir A R, Kawasakij. De-colorization of molasses. wastewater using activated carbon prepared from cane bagasse[J]. Carbon, 1997, 35(9): 1217-1221.

[4] Lua A C, Gua J. Activated carbon prepared from oil palm stone by one-step CO_2 activation for gaseous pollutant removal[J]. Carbon, 2000, 38: 1089-1097.

[5] Laine J, Calafat A, Labady M. Preparation and characterization of activated carbon from coconut shell impregnated with phosphoric acid[J]. Carbon, 1989, 27(2): 191-195.

[6] Jagtoyen M, Derbyshire F. Activated carbons from yellow polar and white oak by H_3PO_4 activation[J]. Carbon, 1998, 36(7/8): 1085-1097.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net