

耐有机溶剂低温碱性脂肪酶产酶条件优化及其酶学性质

严晓云, 石红璆, 查代明*, 余甜甜, 张炳火, 李汉全 (九江学院药学与生命科学学院, 江西九江 332000)

摘要 [目的]研究沙雷氏菌 JXJ-54 胞外脂肪酶的产酶条件以及粗酶酶学性质。[方法]以沙雷氏菌 JXJ-54 为出发菌株, 采用单因素分析优化其产胞外脂肪酶的条件并对该酶进行酶学性质研究。[结果]该菌株的最佳产酶条件为牛肉浸膏 10 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、菜籽油乳化液体积分数 2.25%, 初始 pH 9.0、培养温度 20 °C、装样量 40 mL、接种量 2%、发酵时间 20 h。JXJ-54 脂肪酶的最适底物为对硝基苯酚辛酸酯和对硝基苯酚癸酸酯, 在 30 °C、pH 8.5~9.5 时酶活力最高, 且具有一定的热稳定性和较好的 pH 稳定性; 酶样品受到多数供试金属离子和 EDTA 的抑制, 在供试表面活性剂和有机溶剂中具有良好耐受性, 甚至处于激活状态。[结论]该菌株能利用简单的发酵培养基达到较好的产酶效果, 其所产胞外脂肪酶为低温碱性脂肪酶, 具有一定的热稳定性和较好的 pH 稳定性, 在供试表面活性剂和有机溶剂中具有较好的耐受性, 在食品加工、洗涤剂、低温环境修复等低温碱性环境的工业领域中有一定的应用潜力。

关键词 低温碱性脂肪酶; 有机溶剂耐受性; 表面活性剂耐受性; 沙雷氏菌属

中图分类号 Q815

文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)03-0076-06

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.03.025

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Optimization of Enzyme Production Conditions and Enzymatic Properties of Organic Solvent-Tolerant and Cold-Adapted Alkaline Lipase

YAN Xiao-yun, SHI Hong-qi, ZHA Dai-ming et al (School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract [Objective] To study the enzyme production conditions and crude enzyme properties of *Serratia* JXJ-54 extracellular lipase. [Method] In order to maximize extracellular lipase production from *Serratia* JXJ-54, enzyme production conditions were optimized by single factor analysis. [Result] A maximum extracellular lipase production was achieved after 20 h fermentation in 40 mL medium, consisting of beef extract 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, and rapeseed oil emulsion 2.25% (V/V), at an initial pH 9.0 in 250 mL erlenmeyer flask with 2% inoculum at 20 °C. The best substrates of the crude lipase were *p*-nitrophenyl caprylate and *p*-nitrophenyl decanoate. The crude lipase exhibited highest activity at 30 °C and pH 8.5 to 9.5, it had some thermal stability and good pH stability. Enzyme samples were inhibited by most metal ions and EDTA, and were well tolerated or even activated in surfactants and organic solvents. [Conclusion] The strain JXJ-54 can use simple fermentation medium to obtain better lipase production, its cold-adapted alkaline lipase has some thermostability and better pH stability and shows high tolerance to the tested surfactants and organic solvents. Therefore, in the industrial field of low temperature and alkaline environment, such as food processing, detergent and low temperature environmental remediation, the JXJ-54 lipase has potential applications.

Key words Cold-adapted alkaline lipase; Organic solvent tolerance; Surfactant tolerance; *Serratia*

脂肪酶(triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3)广泛存在于动植物和微生物中, 既能在油水界面上催化酰基甘油水解, 又能在微水相或非水相中催化转酯、酯化、氨解、醇解、酸解等多种化学反应, 且催化反应具有良好的化学选择性、区域选择性和/或立体选择性^[1]。微生物脂肪酶具有资源丰富、催化活性多样、稳定性高、工业生产适用性好等优点, 已成为工业用脂肪酶的主要来源, 广泛应用于食品、洗涤剂、饲料、生物能源、精细化工、医药等领域^[2-3]。

有机溶剂耐受性是评价脂肪酶性能的重要指标, 也是脂肪酶资源挖掘的热点方向。虽然关于有机溶剂耐受性脂肪酶的研究报道较多^[4-6], 但是从沙雷氏菌属(*Serratia*)细菌中筛选出有机溶剂耐受性脂肪酶的研究报道较少。Zhao等^[7]对粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*) ECU1010 胞外脂肪酶进行了纯化, 并对该纯酶进行了酶学性质研究, 发现该脂肪酶具有良好的有机溶剂耐受性, 这是首次关于沙雷氏菌脂肪酶具有有机溶剂耐受性的研究报道。朱绮霞等^[8]在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)中高效表达了粘质沙雷氏菌脂肪酶 LipA, 酶学性质表明 LipA 对一些有机溶剂有较好的耐

受性。司冠儒^[9]从土壤中筛选出一株脂肪酶活力较高的粘质沙雷氏菌 JNS3-9, 通过 PCR 技术克隆了其脂肪酶基因 *lipA*, 并在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 中实现了高效表达, 酶学性质表明 LipA 对有机溶剂有一定的耐受性。Ugur等^[10]从生乳中筛选出一株产脂肪酶的格氏沙雷氏菌(*S. grimesii*) RB06-22, 对部分纯化后的胞外脂肪酶进行了酶学性质研究, 结果表明该脂肪酶对一些有机溶剂有一定的耐受性, 其中正己烷对该酶有强烈的激活作用。李婧珏等^[11]克隆了源于北极冻土沙雷氏菌 BOB 的脂肪酶基因 *lip18*, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中实现了活性表达, 酶学性质表明 Lip18 具有较好的有机溶剂耐受性。García-Silvera等^[12]从石油污染的土壤中筛选出一株产脂肪酶的粘质沙雷氏菌 SM3, 甲磺酸乙酯诱变处理后获得了一株产脂肪酶活力较高的突变株 SMRG4, 其胞外脂肪酶具有良好的有机溶剂耐受性。笔者以沙雷氏菌 JXJ-54 为对象, 研究其胞外脂肪酶的产酶条件以及粗酶酶学性质, 旨在为进一步应用提供理论基础和技术指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。沙雷氏菌 JXJ-54, 前期分离并用甘油管保藏于超低温冰箱中。

1.1.2 培养基。LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物

基金项目 九江学院校级科研项目(8500350)。

作者简介 严晓云(1998—), 女, 江西南城人, 从事微生物脂肪酶资源研究。*通信作者, 讲师, 博士, 从事微生物脂肪酶资源及基因表达调控研究。

收稿日期 2018-09-21

5 g/L、NaCl 10 g/L, 自然 pH, 固体培养基另加琼脂条 18 g/L; 基础发酵培养基: 麦芽糖 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、 $MgSO_4$ 0.5 g/L、大豆油乳化液体积分数 2%, pH 7.0。大豆油乳化液: 大豆油与体积分数 2% 的 PVA 按 1:3 的比例混合, 10 000 r/min 乳化 10 min 即可。

1.2 方法

1.2.1 脂肪酶活力的测定。挑取生长于 LB 固体培养基上的沙雷氏菌 JXJ-54 单菌落, 接种到 4 mL LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 培养过夜, 然后以 2% 的接种量接种于 20 mL 基础发酵培养基中, 30 °C、160 r/min 发酵 24 h; 所有发酵液于 4 °C、4 500 r/min 离心 15 min, 所得上清液即为胞外脂肪酶粗酶, 酶活力测定参考文献[6]。

1.2.2 培养基的优化。

1.2.2.1 碳源。在基础发酵培养基的基础上改变碳源组成, 按照上述条件进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定碳源对产酶的影响, 对照组不添加碳源, 其酶活力设为 100%。

1.2.2.2 氮源。在上述优化培养基的基础上改变氮源组成, 按照上述条件进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定氮源对产酶的影响, 对照组不添加氮源, 其酶活力设为 100%; 分别添加 7.50、8.75、10.00、11.25、12.50 g/L 最佳氮源以确定其添加量对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.2.3 金属离子。在上述优化培养基的基础上改变金属离子的组成, 按照上述条件进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定金属离子对产酶的影响, 对照组不添加金属离子, 其酶活力设为 100%。

1.2.2.4 诱导剂。在上述优化培养基的基础上改变油脂诱导剂的组成, 按照上述条件进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定诱导剂对产酶的影响, 对照组不添加诱导剂, 其酶活力设为 100%; 分别添加 2.00%、2.25%、2.50%、2.75%、3.00% 最佳诱导剂以确定其添加量对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.3 发酵条件的优化。

1.2.3.1 初始 pH。采用优化发酵培养基, 在初始发酵条件的基础上改变初始 pH 进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定发酵培养基的初始 pH 对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.3.2 温度。采用优化发酵培养基, 在上述优化发酵条件的基础上改变温度进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定发酵温度对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.3.3 装样量。采用优化发酵培养基, 在上述优化发酵条件的基础上改变 250 mL 三角烧瓶中的培养基体积进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定装样量对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.3.4 接种量。采用优化发酵培养基, 在上述优化发酵条件的基础上改变种子液的接种量进行发酵培养, 测定脂肪酶活力以确定接种量对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.3.5 发酵时间。采用优化发酵培养基, 在上述优化发

酵条件下进行发酵培养, 分别在不同时间段取样进行脂肪酶活力测定以确定发酵时间对产酶的影响, 最佳组的酶活力设为 100%。

1.2.4 酶学性质研究。

1.2.4.1 底物特异性。以对硝基苯酚乙酸酯、对硝基苯酚丁酸酯、对硝基苯酚辛酸酯、对硝基苯酚葵酸酯、对硝基苯酚月桂酸酯、对硝基苯酚豆蔻酸酯和对硝基苯酚棕榈酸酯为底物, 分别测定脂肪酶活力以确定底物对酶活力的影响, 最高酶活力设为 100%。

1.2.4.2 温度对酶活力的影响。在最适底物条件下, 分别测定不同反应温度(20~55 °C)下的脂肪酶活力以确定反应温度对酶活力的影响, 最高酶活力设为 100%。不同温度(30~60 °C)下温浴处理酶样品, 1 h 后分别测定脂肪酶活力以确定其热稳定性, 处理前的酶活力设为 100%。

1.2.4.3 pH 对酶活力的影响。在最适底物、温度条件下, 分别在 Na_2HPO_4-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH 5.0~8.0)和 $Tris-HCl$ 缓冲液(50 mmol/L, pH 8.0~10.5)中测定脂肪酶活力以确定反应 pH 对酶活力的影响, 最高酶活力设为 100%。在不同 pH 缓冲液中 28 °C 摇床处理酶样品, 1 h 后测定脂肪酶活力以确定其 pH 稳定性, pH 7.0 组的酶活力设为 100%。

1.2.4.4 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响。酶样品中分别加入 $NaCl$ 、 KCl 、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $ZnCl_2$ 、 $CuCl_2$ 、 $FeCl_3$ 和 EDTA, 使其终浓度为 10 mmol/L, 将加入等量双蒸水的酶样品设为对照组, 28 °C 摇床处理 1 h 后, 分别测定脂肪酶活力以确定金属离子和 EDTA 对酶活力的影响, 对照组的酶活力设为 100%。

1.2.4.5 表面活性剂对酶活力的影响。酶样品中分别加入 SDS、CTAB 和 Triton X-100, 使其终浓度为 0.10%, 加入等量双蒸水的酶样品设为对照组, 28 °C 摇床处理 1 h 后, 分别测定脂肪酶活力以确定表面活性剂对酶活力的影响, 对照组的酶活力设为 100%。

1.2.4.6 有机溶剂对酶活力的影响。酶样品中分别加入异丙醇、甲醇、乙腈、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷和正己烷, 使其体积分数分别为 10%~50%, 加入等量双蒸水的酶样品设为对照组, 28 °C 摇床处理 1 h 后, 分别测定脂肪酶活力以确定有机溶剂对酶活力的影响, 对照组的酶活力设为 100%。

1.2.5 数据处理。数据来自 3 次独立重复试验, 以平均数±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 培养基的优化

2.1.1 碳源。由图 1 可知, 葡萄糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖均显著抑制菌株 JXJ-54 产酶, 其中蔗糖的抑制作用最强。因此, 发酵培养基中无需额外添加碳源。这些碳源的存在不利于菌株 JXJ-54 产脂肪酶, 可能是由于它们的分解代谢物抑制脂肪酶基因的表达。

2.1.2 氮源。由图 2A 可知, 硝酸钠、尿素、酵母提取物、牛肉浸膏、蛋白胨均显著促进菌株 JXJ-54 产酶, 其中牛肉浸膏的促进作用最强, 因此选择牛肉浸膏作为该菌株产酶的最佳

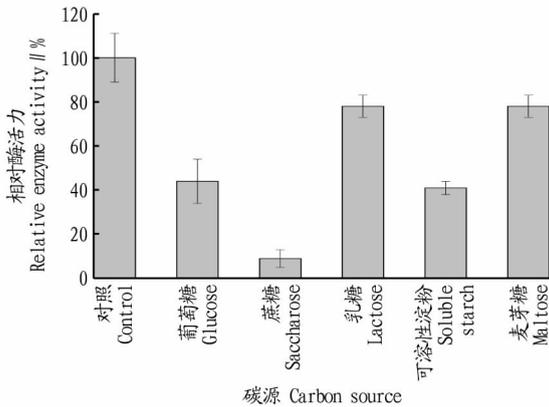


图1 碳源对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 1 Influences of carbon source on lipase production of strain JXJ-54

氮源。由图 2B 可知,牛肉浸膏加入量为 10 g/L 时,菌株的产

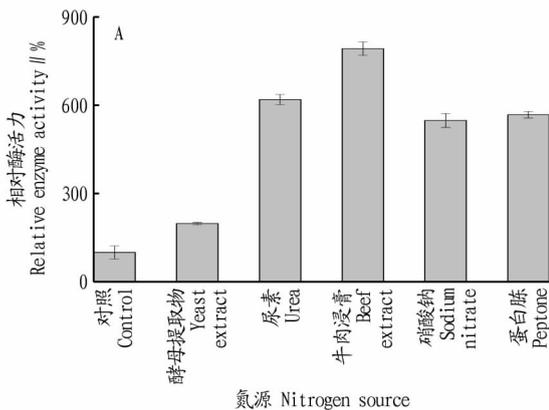


图2 氮源(A)及牛肉浸膏加入量(B)对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 2 Influences of nitrogen source (A) and beef extract dosage (B) on lipase production of strain JXJ-54

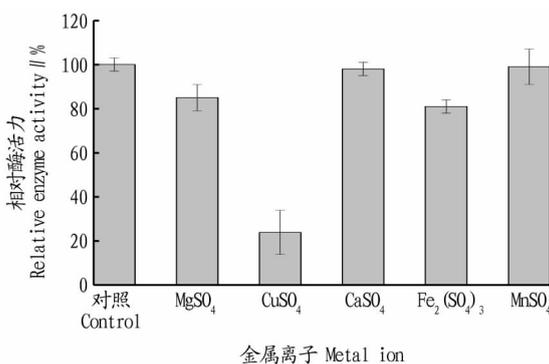
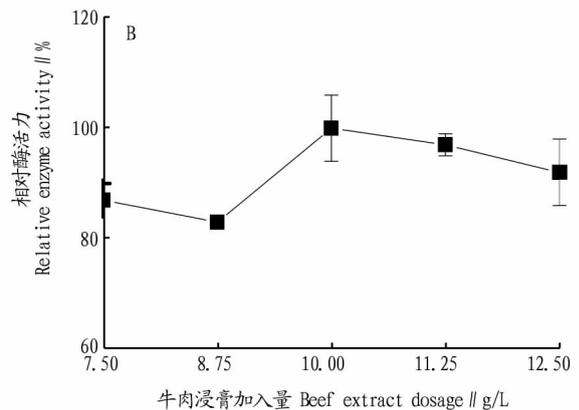


图3 金属离子对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 3 Influences of metal ions on lipase production of strain JXJ-54

2.2 发酵条件的确定

2.2.1 初始 pH。由图 5 可知,菌株 JXJ-54 在初始 pH 为 4.0~10.0 的发酵培养基中具有较高的产酶活力,其中初始 pH 为 9.0 时菌株产酶活力最高,因此选择 9.0 为该菌株产酶的最佳初始 pH。

2.2.2 温度。由图 6 可知,发酵温度对菌株 JXJ-54 产酶的影响较大,发酵温度为 20 ℃时菌株产酶活力最高,因此选择

酶活力最强,因此选择该浓度为牛肉浸膏的最适加入量。

2.1.3 金属离子。由图 3 可知,供试金属离子均不同程度地抑制菌株 JXJ-54 产酶,其中 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{3+} 显著抑制菌株产酶,而 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 的抑制作用没有显著性。因此,发酵培养基中无需额外添加金属离子。

2.1.4 诱导剂。由图 4A 可知,供试油脂乳化液作为诱导剂显著促进菌株 JXJ-54 产酶,其中菜籽油的促进作用最强,其次为葵花籽油、玉米油、芝麻油、花生油和大豆油,但是它们之间的促进作用没有显著差异,因此选择菜籽油乳化液作为该菌株产酶的最佳诱导剂。与不添加诱导剂的对照组相比,各诱导剂组的脂肪酶活力只增加了 20%~29%,这可能是由于诱导剂为菌株 JXJ-54 提供了额外的碳源所致,说明该菌株可能是组成型表达胞外脂肪酶。由图 4B 可知,菜籽油乳化液加入量为 2.25% 时,菌株产酶活力最强,因此选择该体积分数为菜籽油乳化液的最适加入量。

20 ℃为该菌株产酶的最佳发酵温度。

2.2.3 装样量。由图 7 可知,装样量对菌株 JXJ-54 产酶的影响不大,装样量为 30 mL 时菌株产酶活力最高,由于装样量为 30 mL 与 40 mL 时的酶活力没有显著差异,因此选择 40 mL 为该菌株产酶的最佳装样量。

2.2.4 接种量。由图 8 可知,接种量对菌株 JXJ-54 产酶的影响较大,随着接种量的增加,菌株产酶活力逐渐增高,接种量为 2% 时产酶活力达到最高,随后缓慢下降,因此选择 2% 为该菌株产酶的最佳接种量。

2.2.5 发酵时间。由图 9 可知,发酵时间是影响菌株 JXJ-54 产酶的关键因素之一,随着发酵时间的延长,菌株产酶活力迅速增高,12 h 达到产酶的稳定期,24 h 达到产酶的峰值,随后逐渐下降。由于 20 h 的酶活力与 24 h 相比没有显著差异,因此选择 20 h 为该菌株产酶的最佳发酵时间。

2.3 酶学性质研究

2.3.1 底物特异性。由图 10 可知,JXJ-54 脂肪酶特异性水解中链对硝基苯酚酯,其最适底物为对硝基苯酚辛酸酯和对硝基苯酚葵酸酯,与其他沙雷氏菌属脂肪酶的底物特异性存在较大的差异^[7,11,13]。

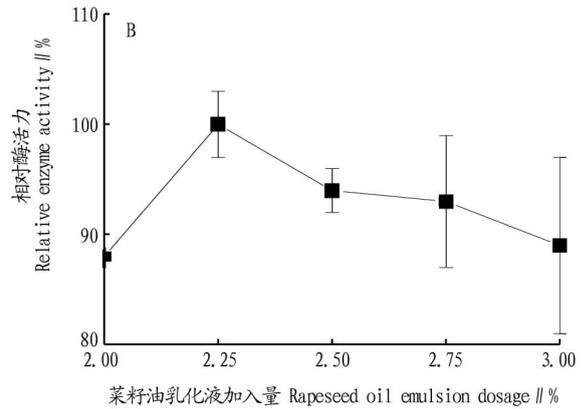
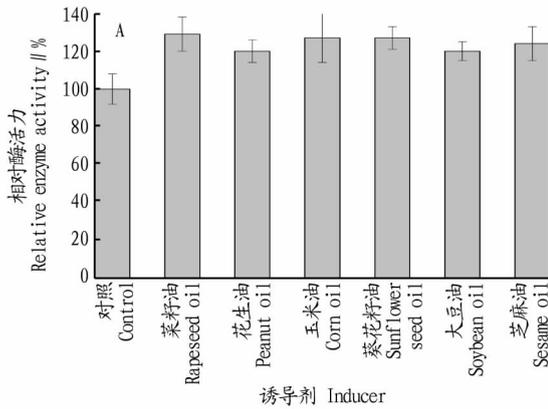


图 4 诱导物 (A) 及菜籽油乳化液加入量 (B) 对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 4 Influences of inducer (A) and rapeseed oil emulsion dosage (B) on lipase production of strain JXJ-54

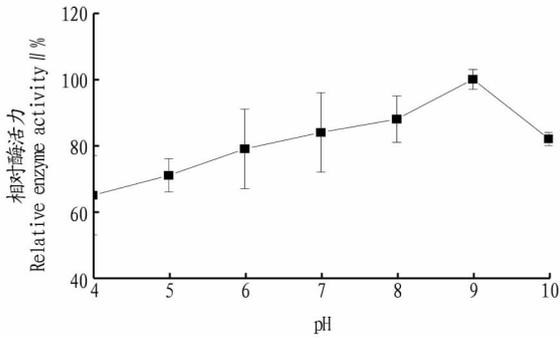


图 5 初始 pH 对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 5 Influences of initial pH on lipase production of strain JXJ-54

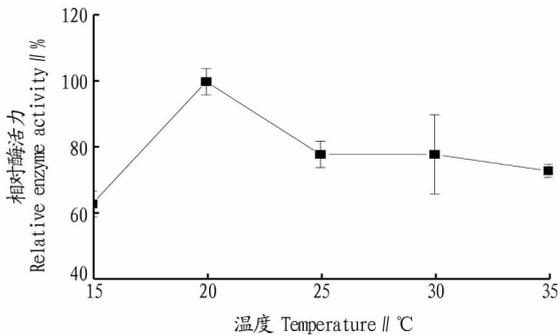


图 6 发酵温度对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 6 Influences of fermentation temperatures on lipase production of strain JXJ-54

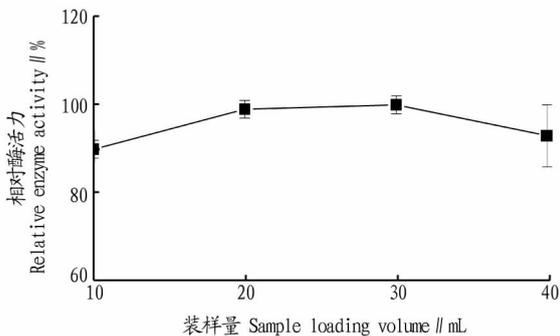


图 7 装样量对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 7 Influences of sample loading volume on lipase production of strain JXJ-54

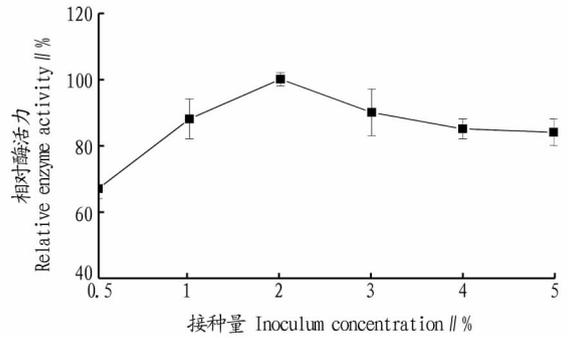


图 8 接种量对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 8 Influences of inoculum concentrations on lipase production of strain JXJ-54

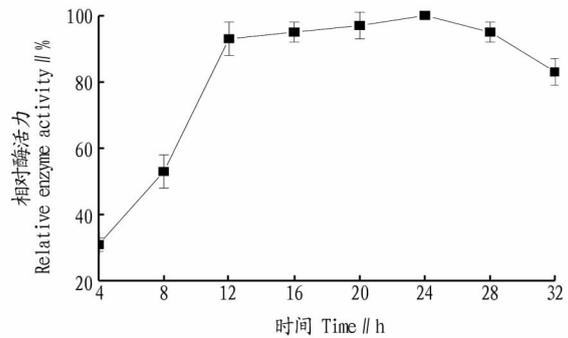
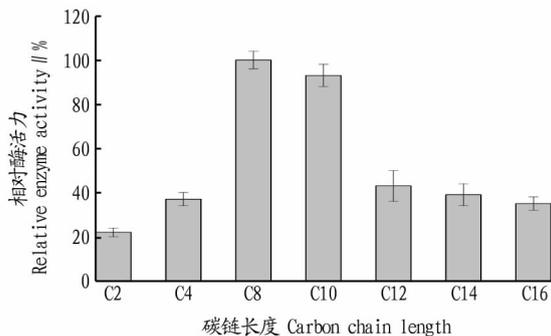


图 9 发酵时间对菌株 JXJ-54 产脂肪酶的影响

Fig. 9 Influences of fermentation time on lipase production of strain JXJ-54

2.3.2 温度对酶活力的影响。由图 11A 可知, JXJ-54 脂肪酶的最适反应温度为 30 °C, 20 °C 时其酶活力较低, 保持在 45%, 而 25~55 °C 时其酶活力较高, 均保持在 85% 以上。由图 11B 可知, 酶样品在 30~60 °C 下温浴 1 h 后, 其残余酶活力急剧下降, 50~60 °C 的残余酶活力只有温浴处理前的 20% 左右。JXJ-54 脂肪酶的温度特性与 Lip18 脂肪酶类似^[11]。一般来说, 最适反应温度低于 40 °C 的酶属于低温酶, 且具有一定的热稳定性^[14]。因此, JXJ-54 脂肪酶为低温脂肪酶, 在 30~40 °C 时具有较好的热稳定性, 这对该酶应用于生物转化领域非常有利, 特别是食品加工和油脂加工领域^[15]。



注: C2. 对硝基苯酚乙酸酯; C4. 对硝基苯酚丁酸酯; C8. 对硝基苯酚辛酸酯; C10. 对硝基苯酚癸酸酯; C12. 对硝基苯酚月桂酸酯; C14. 对硝基苯酚豆蔻酸酯; C16. 对硝基苯酚棕榈酸酯

Note: C2. *p*-nitrophenyl acetate; C4. *p*-nitrophenol butyrate; C8. *p*-nitrophenol caprylate; C10. *p*-nitrophenol decanoate; C12. *p*-nitrophenol laurate; C14. *p*-nitrophenol myristate; C16. *p*-nitrophenol palmitate

图10 JXJ-54 脂肪酶粗酶的底物特异性

Fig. 10 Substrate specificity of lipase crude enzyme JXJ-54

2.3.3 pH 对酶活力的影响。由图 12A 可知, JXJ-54 脂肪酶

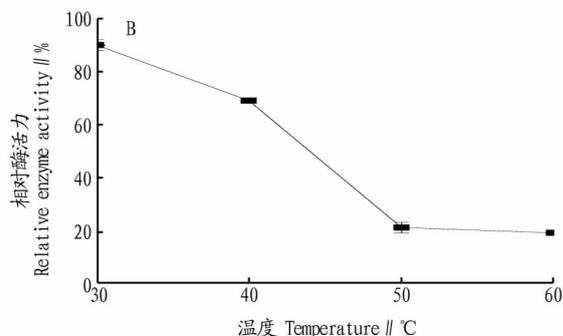
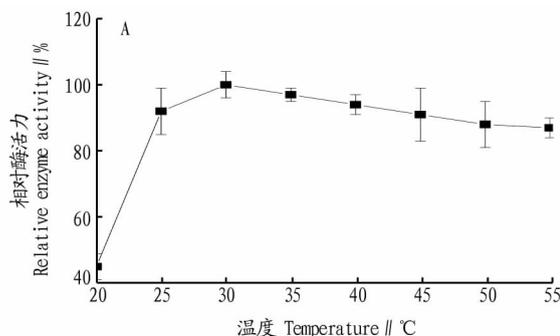


图11 温度对 JXJ-54 脂肪酶粗酶活力(A)和稳定性(B)的影响

Fig. 11 Influences of temperatures on crude enzyme activity (A) and stability (B) of JXJ-54 lipase

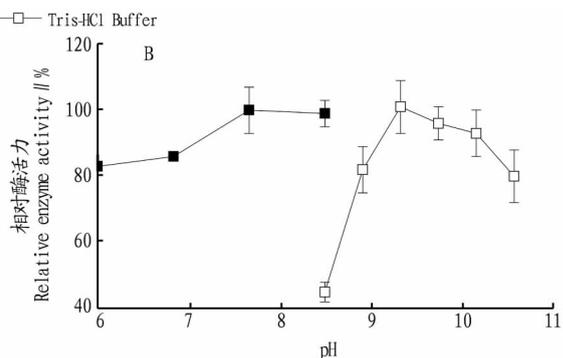
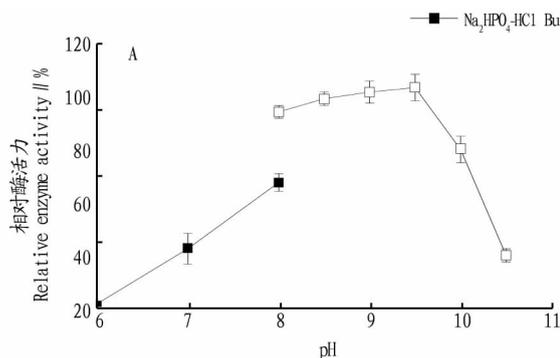


图12 pH 对 JXJ-54 脂肪酶粗酶活力(A)和稳定性(B)的影响

Fig. 12 Influences of pH on crude enzyme activity (A) and stability (B) of JXJ-54 lipase

2.3.5 表面活性剂对酶活力的影响。由图 14 可知, 表面活性剂对 JXJ-54 脂肪酶活力具有不同的影响, 阳离子表面活性剂 CTAB 显著激活酶活力, 而阴离子表面活性剂 SDS 和非离子表面活性剂 Triton X-100 对酶活力没有显著影响, 与 RB06-22 脂肪酶和 SMRG4 脂肪酶类似^[10,12]。可见, JXJ-54 脂肪酶在供试表面活性剂中具有良好的耐受性, 在洗涤剂配方中可能具有应用潜力。

的最适反应 pH 为 8.5~9.5, pH 8.0~10.0 时其酶活力保持在 70% 以上, pH 低于 8.0 或高于 10.0 时其酶活力急剧下降。由图 12B 可知, 酶样品在不同 pH 缓冲液 (5.0~10.5) 中 28 °C 处理 1 h 后, 其残余酶活力均保持在 80% 以上。JXJ-54 脂肪酶的 pH 特性与 RB06-22 脂肪酶和 SMRG4 脂肪酶类似^[10,12]。综上, JXJ-54 脂肪酶为低温碱性脂肪酶, 具有较宽的最适反应 pH 和较好的 pH 稳定性, 在低温碱性环境的工业领域具有较大的应用潜力, 比如洗涤剂配方和低温环境修复。

2.3.4 金属离子和 EDTA 对酶活力的影响。由图 13 可知, 金属离子和 EDTA 对 JXJ-54 脂肪酶活力具有不同的影响, K⁺ 和 Mg²⁺ 对酶活力具有显著激活作用, Ca²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺ 和 EDTA 对酶活力具有显著抑制作用, Na⁺ 对酶活力没有显著作用。由 EDTA 抑制酶活力可知, JXJ-54 脂肪酶为金属酶, 其催化活性需要一定的金属离子参与。一般来说, Ca²⁺ 和 Mn²⁺ 对脂肪酶活力具有激活作用, 但它们却抑制 JXJ-54 脂肪酶活力, 与 LipA 脂肪酶和 RB06-22 脂肪酶相反^[8,10], 与 Lip42 脂肪酶、UD-8 脂肪酶和 CICC1368 脂肪酶类似^[16-18]。

2.3.6 有机溶剂对酶活力的影响。由表 1 可知, 有机溶剂对 JXJ-54 脂肪酶活力的影响与其 lg P 值有关。当 lg P < 0 时, 除甲醇和乙醇外, 酶活力随着有机溶剂体积分数的增大而降低, 10%~30% 甲醇、10% 乙腈和 30% 乙醇对酶活力具有显著激活作用, 30%~50% 异丙醇、50% 甲醇、30%~50% 乙腈、50% 乙醇和 30%~50% 丙酮对酶活力具有显著抑制作用, 10% 异丙醇、10% 乙醇和 10% 丙酮对酶活力没有显著影响。

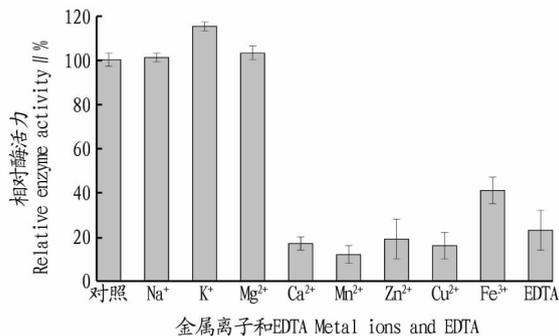


图 13 金属离子和 EDTA 对 JXJ-54 脂肪酶粗酶活力的影响

Fig. 13 Influences of metal ions and EDTA on crude enzyme activity of JXJ-54 lipase

当 $\lg P > 0$ 时,酶活力随着有机溶剂体积分数的增大而增强,30%~50%乙酸乙酯、30%~50%三氯甲烷和 50%正己烷对酶活力具有显著激活作用,10%乙酸乙酯对酶活力具有显著抑制作用,10%三氯甲烷和 10%~30%正己烷对酶活力没有显著影响。总之,JXJ-54脂肪酶具有良好的有机溶剂耐

表 1 有机溶剂对 JXJ-54 脂肪酶粗酶活力的影响

Table 1 Influences of organic solvents on crude enzyme activity of JXJ-54 lipase

有机溶剂 Organic solvent	$\lg P$	相对酶活力 Relative enzyme activity/%		
		10%	30%	50%
对照 Control	—	100.00±4.51	100.00±6.35	100.00±5.58
异丙醇 Isopropanol	-0.77	107.63±7.43	18.80±5.16	13.73±9.05
甲醇 Methyl alcohol	-0.76	107.63±3.94	154.85±7.16	51.04±7.31
乙腈 Acetonitrile	-0.33	107.87±2.81	45.63±8.12	4.66±3.04
乙醇 Ethyl alcohol	-0.24	101.87±3.04	129.34±9.65	15.28±9.38
丙酮 Acetone	-0.23	100.78±3.73	76.65±3.77	5.31±0.81
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.68	86.06±4.10	117.49±5.75	157.25±6.39
三氯甲烷 Trichloromethane	2.00	103.35±8.85	134.97±5.71	136.01±4.09
正己烷 Hexane	3.50	105.14±6.45	106.11±2.79	176.30±11.28

3 结论

通过单因素分析,确定出沙雷氏菌 JXJ-54 产胞外脂肪酶的最佳发酵培养基为牛肉浸膏 10 g/L、 K_2HPO_4 2 g/L、菜籽油乳化液体积分数 2.25%,最佳发酵条件为初始 pH 9.0、培养温度 20 °C、装样量 40 mL、接种量 2%、发酵时间 20 h。总之,该菌株能够利用简单的发酵培养基达到较好的产酶效果。

从底物、温度、pH、金属离子、EDTA、表面活性剂、有机溶剂等方面研究了沙雷氏菌 JXJ-54 所产胞外脂肪酶粗酶的酶学性质。该酶对中链对硝基苯酚酯有最大水解活力,最适底物为对硝基苯酚辛酸酯和对硝基苯酚葵酸酯;在 30 °C、pH 8.5~9.5 时酶活力最高,且具有较好的温度(30~40 °C)和 pH(5.0~10.5)稳定性; K^+ 和 Mg^{2+} 对酶活力具有显著激活作用, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 和 EDTA 对酶活力具有显著抑制作用, Na^+ 对酶活力没有显著作用;阳离子表面活性剂 CTAB 显著激活酶活力,而阴离子表面活性剂 SDS 和非离子表面活性剂 Triton X-100 对酶活力没有显著影响;酶样品在不同体积分数的异丙醇、甲醇、乙腈、乙醇、丙酮、乙酸乙酯、三氯甲烷和正己烷中具有良好耐受性,甚至处于激活状态。总之,JXJ-54 脂肪酶为低温碱性脂肪酶,具有一定的热稳定

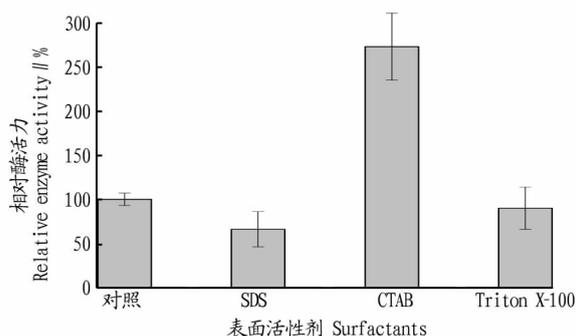


图 14 表面活性剂对 JXJ-54 脂肪酶粗酶活力的影响

Fig. 14 Influences of surfactants on crude enzyme activity of JXJ-54 lipase

受性,这一现象在其他沙雷氏菌属脂肪酶中也有报道^[7-12]。脂肪酶在有机溶剂中呈现良好的稳定性,使其在基于非水相或微水相催化反应的应用领域具有巨大的潜力,比如食品、油脂、新型材料、精细化工、医药、化妆品、生物能源等^[19]。

性和较好的 pH 稳定性,在供试表面活性剂和有机溶剂中具有良好的耐受性。

参考文献

- [1] 查代明,张炳火,李汉全,等.假单胞菌属脂肪酶的分子生物学研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(9):114-121.
- [2] JAEGER K E,EGGERT T. Lipases for biotechnology[J]. Current opinion in biotechnology,2002,13(4):390-397.
- [3] HASAN F,SHAH A A,HAMEED A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and microbial technology,2006,39(2):235-251.
- [4] PENG R,LIN J P,WEI D Z. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* CS-2[J]. Applied biochemistry and biotechnology,2010,162(3):733-743.
- [5] 叶涛. 橄榄树内生菌分离及其耐有机溶剂脂肪酶研究[D]. 福州:福建师范大学,2011.
- [6] 谢玉婷,查代明,石红璆,等. *Burkholderia* sp. JXJ-16 低温耐有机溶剂脂肪酶产酶条件优化及粗酶酶学性质[J]. 食品工业科技,2017,38(4):207-213.
- [7] ZHAO L L,XU J H,ZHAO J, et al. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010[J]. Process biochemistry,2008,43(6):626-633.
- [8] 朱绮霞,陈英,张博,等. 粘质沙雷氏菌脂肪酶基因的克隆表达和酶学性质的研究[J]. 生物技术,2010,20(5):12-16.
- [9] 司冠儒. 粘质沙雷氏菌脂肪酶基因的克隆及其在枯草芽孢杆菌中的表达和发酵优化[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [10] UGUR A,BORAN R. Production and characterization of a cold-active and n-hexane activated lipase from a newly isolated *Serratia grimesii* RB06-22[J]. Biocatalysis and biotransformation,2014,32(4):222-230.

尝试利用酒糟中的成分以及糖厂的废糖蜜等作为培养基进行培养。可以通过正交试验确定蛋白饲料水、DDGS 水、废糖及酵母泥的最佳配比^[12],在培养原料上节省资源,便于扩大培养和投入实际生产。但由于培养的效果没有达到预期,因此,该试验中仍然采用了经典的酵母菌培养基,培养条件简单,酵母菌对培养基中的营养成分要求不高,仅在大量培养时消耗大量的葡萄糖、蛋白胨、酵母膏等成分。

3.2 啤酒活性干酵母生长曲线的测定 由于凝血质为啤酒活性干酵母生长繁殖过程中产生的初级代谢产物,因此,菌体的量越多,所含有的凝血质越多,测定其生长曲线非常必要。对啤酒活性干酵母生长曲线的测定可以采用干法或湿法 2 种测定方法。由于湿法测定中对于发酵液过滤的效果不能完全一致,因而导致测定结果不够准确。但采用干法测定时,一定保证在烘干处理过程中温度不能太高,否则会破坏蛋白质的生物活性,导致其出现热变性,因此温度要严格控制,控制在 50 ℃ 以下。

3.3 凝血质提取过程中各种试验因素的影响 培养后获得的啤酒活性干酵母细胞壁的破坏可以采用多种方法处理,可以采用破壁效果较好的破壁机处理,效果较好;采用超声波破碎会使得细胞壁破坏不均匀,严重的会破坏细胞内蛋白成分,轻微的又不能起到破壁作用,效果不好;研钵研磨仅适合实验室的小规模试验,不适合扩大生产。因此,该试验采用破壁机处理。

乙醇浓度过低(75%)浸提效果不好,浓度过高,会产生大量的难于与蛋白质分离的物质,且会造成乙醇的浪费。提取的温度过低,不利于凝血质的释放,温度过高,容易造成凝血质的部分活性的破坏或丧失。一次丙酮浓度过高会造成浪费,但如果浓度过低则会导致其中残留的乙醚无法彻底除去。磁力搅拌器转子的转数高低的影响较小,但如果转数过高容易造成温度升高,要采用恒温磁力搅拌器处理。因此,凝血质提取过程中各种试验影响因素的具体参数为:乙醇浓

度 85%;提取温度 35 ℃;一次丙酮浓度 70%;转数为 600 r/min。

3.4 凝血质提取及纯化比较 啤酒活性干酵母发酵 9 d 干菌体量达 1.270 g/250 mL 活化液,凝血质的提取量为 0.165 g/250 mL 活化液,提取率达 12.992%,与文献^[13]中的提取率提高 5 百分点;纯化后凝血质量为 0.215 g/250 mL,纯化率达 13%,与文献^[13]中的纯化率提高 4 百分点。因此,试验达到了提取优化和纯化改进的效果。

参考文献

- [1] 韩邦志,谢金鲜. 中药止血与凝血机制的研究进展[J]. 广西中医药, 2009,32(2):6-8.
- [2] DUSSE L M SA, DAS GRACAS CARVALHO M, COOPER A J, et al. Tissue factor and tissue factor Pathway inhibitor: A potential role in pregnancy and obstetric vascular complications? [J]. Clin Chim Acta, 2006, 372(1/2):43-46.
- [3] 姚娟,肖冬光,王亚楠. “安琪”啤酒活性干酵母酿造特性研究[J]. 酿造科技, 2003(6):40-41.
- [4] 王岁楼,张平之,张欣,等. 酵母 SOD 形成的生理学研究[J]. 工业微生物, 1997, 27(3):20-23.
- [5] 吴江,陈代杰. 微生物中超氧化物歧化酶含量及分布[J]. 中国医药工业杂志, 1997, 28(11):495-498.
- [6] 王岁楼,张鑫,张平之,等. 活性干酵母 SOD 摇瓶发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 2000, 30(3):36-39.
- [7] 钱铭镛. 发酵工程最优化控制[M]. 南京:江苏科学技术出版社, 1998:150-153.
- [8] ZIVELIN A, BAUDUER F, DUCOUT L, et al. Factor XI deficiency in French Basques is caused predominantly by an ancestral Cys38Arg mutation in the factor XI gene[J]. Blood, 2002, 99(7):2448-2454.
- [9] WANG W, JOHN WANG Y, KELNNER D N. Coagulation factor VIII: Structure and stability[J]. International journal of pharmaceutics, 2003, 259:1-15.
- [10] TOMAZ C T, QUEIROZ J A. Fractionation of *Trichoderma reesei* cellulases by hydrophobic interaction chromatography on phenyl-sepharose[J]. Biotechnology letters, 2004, 26(3):223-227.
- [11] SOLHEIM B G, FLESLAND O, BROSSTAD F, et al. Improved preservation of coagulation factors after pre-storage leukocyte depletion of whole blood[J]. Transfusion and apheresis science, 2003, 29(2):133-139.
- [12] 田小海,崔洪艳,王莘. 酒糟为基质提取凝血质的白地霉培养条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(13):12-13, 16.
- [13] 刘诗音. 酵母菌类发酵提取凝血质及凝血作用的研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2011.

(上接第 81 页)

- [11] 李婧玘,李仁宽,林娟,等. 粘质沙雷氏菌低温脂肪酶的基因克隆与酶学性质分析[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2016, 44(5):738-745.
- [12] GARCÍA-SILVERA E E, MARTÍNEZ-MORALES F, BERTRAND B, et al. Production and application of a thermostable lipase from *Serratia marcescens* in detergent formulation and biodiesel production[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2018, 65(2):156-172.
- [13] YAO H Y, YU S W, ZHANG L D, et al. Isolation of a novel lipase gene from *Serratia liquefaciens* S33 DB-1, functional expression in *Pichia pastoris* and its properties[J]. Molecular biotechnology, 2008, 38(2):99-107.
- [14] NICHOLS D, BOWMAN J, SANDERSON K, et al. Developments with Antarctic microorganisms: Culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes[J]. Current opinion in biotechnology, 1999, 10(3):240-246.
- [15] 梁秋艳. 低温脂肪酶产生菌株的筛选、发酵条件优化及其酶学性质研究[D]. 石河子:石河子大学, 2014.
- [16] 张银波. 脂肪酶基因的克隆与表达研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2009.
- [17] 王刚. 耐有机溶剂脂肪酶高活性菌株选育、酶合成及酶学特性研究[D]. 长春:吉林农业大学, 2011.
- [18] 王迪. 发酵性丝孢酵母脂肪酶与蛋白酶发酵及性质的比较[D]. 大连:大连工业大学, 2012.
- [19] 查代明. 防御假单胞菌 Pf-5 脂肪酶 LipA 的分子鉴定、酶学性质及基因表达调控研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2014.