

不同表面活性剂条件下脂肪酶 GZEL 的催化行为

王方华¹, 陈吴翀¹, 杨博², 王永华¹

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 利用自动电位滴定仪测定脂肪酶GZEL在不同类型及浓度的表面活性剂条件下对该酶脂肪酶活力和磷脂酶活力及其最适反应pH条件的影响, 为进一步评估该脂肪酶在洗涤剂工业中的应用价值提供科学指导。研究发现: 阴离子型和阳离子型表面活性剂对该酶的脂肪酶活力和磷脂酶活力发挥均起抑制作用, 并且随着表面活性剂浓度增加, 抑制作用更为显著, 高于其临界胶束浓度将导致酶蛋白活力完全丧失; 在阴离子型表面活性剂(N-月桂酰肌氨酸钠、十二烷基硫酸钠、脱氧胆酸钠)存在情况下, GZEL发挥磷脂酶活力的最适pH由6.0变为7.0。不同非离子型表面活性剂在低于其各自临界胶束浓度条件下对GZEL酶活力发挥所起调控作用不同: 7.0 mM浓度条件下, 辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷使该酶的脂肪酶活力提高(22.97%), 磷脂酶活力提高3.11%; 而在0.05 mM浓度条件下, TritonX-100使该酶脂肪酶活力降低4.05%, 磷脂酶活力提升0.14%; 在高于TritonX-100临界胶束浓度条件下, 酶蛋白仍保留50%左右酶活力, 但在高于辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷临界胶束浓度条件下, 其活性则完全丧失。两性离子型表面活性剂对GZEL酶活力影响最大, 导致酶蛋白完全失活。

关键词: 脂肪酶; 禾谷镰孢菌; 表面活性剂; 临界胶束浓度

文章编号: 1673-9078(2020)08-56-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1030

Catalytic Behaviors of *Gibberella zeae* Lipase (GZEL) in the Presence of Different Surfactants

WANG Fang-hua¹, CHEN Wu-chong¹, YANG Bo², WANG Yong-hua¹

(1. School of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Effects of different types and concentrations of surfactants on the lipase/ activity and phospholipase activity of the *Gibberella Zeae* lipase (GZEL) and its corresponding optimum pH were examined by automatic potentiometric titration, to provide scientific guidance for further evaluation on the application potential of the lipase in the detergent industry. Results revealed that both anionic and cationic surfactants exerted inhibitory effects on the lipase activity and phospholipase activity of GZEL, and the inhibition increased with an increase of the surfactant concentration, with a surfactant concentration higher than its critical micelle concentration causing the complete loss of the activity of the enzyme protein. In the presence of an anionic surfactant (sodium N-lauroylsarcosinate, sodium dodecyl sulfate (SDS), sodium taurodeoxycholate (NATDC), the optimal pH for the phospholipase activity of GZEL was changed from pH 6.0 to pH 7.0. Different nonionic surfactants had different effects on both activities of GZEL at concentrations lower than their corresponding critical micelle concentrations: At a concentration of 7.0 mM, octyl- β -d-glucopyranoside increased the lipase activity (by 22.97%) and phospholipase activity (by 3.11%) of GZEL, whereas, at 0.05 mM, Triton X-100 reduced the lipase activity (by 4.05%) of GZEL, but increased the phospholipase activity (0.14%) of GZEL.

引文格式:

王方华,陈吴翀,杨博,等.不同表面活性剂条件下脂肪酶GZEL的催化行为[J].现代食品科技,2020,36(8):56-64

WANG Fang-hua, CHEN Wu-chong, YANG Bo, et al. Catalytic behaviors of *Gibberella zeae* lipase (GZEL) in the presence of different surfactants [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 56-64

收稿日期: 2019-10-25

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2018YFC0311100); 国家自然科学基金资助项目(31671791)

作者简介: 王方华(1982-), 男, 副研究员, 研究方向: 食品酶工程

通讯作者: 王永华(1973-), 女, 教授, 研究方向: 工业酶与生物脂质及食品安全

When the concentration of Triton X-100 was higher than its critical micelle concentration, GZEL about 50% of the enzyme activity was still retained, whereas, octyl- β -D-glucopyranoside at a concentration higher than its critical micelle concentration made the activity of GZEL lose completely. Zwitterionic surfactant had the greatest effect on the activity of GZEL, resulting in the complete inactivation of enzyme protein.

Key words: lipase; *Gibberella zeae*; surfactants; critical micelle concentration

脂肪酶 (EC 3.1.1.3) 是一类羧酸酯键水解酶, 可催化甘油三酯水解为甘油和脂肪酸。脂肪酶添加到洗涤剂中可大幅提高洗涤效果, 因此, 被广泛应用于洗涤剂行业中^[1-5]。添加酶制剂是近年来国内外洗涤剂工业的发展趋势之一, 对节约水资源, 减少环境污染具有重要意义^[6]。洗涤剂一般由表面活性剂及其他添加剂等组成, 因此洗涤剂用脂肪酶必须能够在表面活性剂存在下保持酶活力^[7]。表面活性剂和脂肪酶可以相互作用, 从而影响脂肪酶的活性。低浓度离子表面活性剂与溶液中大多数脂肪酶形成复合物, 影响脂肪酶的构象稳定性和表面疏水性。较高的表面活性剂浓度可能导致三级蛋白结构的部分或完全展开, 从而抑制酶活力^[8-10]。除此之外, 表面活性剂在溶液中可形成胶束状态, 胶束的形成对脂肪酶活性也有较大影响。Aloulou等^[11]研究了不同表面活性剂对脂肪酶TLL水解活性的影响, 结果发现, 增加表面活性剂浓度会持续抑制脂肪酶TLL的活性, 并且这种抑制作用在表面活性剂以胶束存在时 (\geq 临界胶束浓度) 影响最大。低于临界胶束浓度时, 表面活性剂反而能够促进酶-基质复合物的生成, 从而加速催化水解反应。因此, 研究不同类型的表面活性剂, 尤其是不同浓度条件下表面活性剂对脂肪酶活力的影响, 无论对于选择使用适合的表面活性剂还是洗涤剂用脂肪酶筛选均具有重要意义。

禾谷镰孢菌 (*Gibberella Zeae*) 对小麦和玉米等农作物有致病作用, 能引起农作物病害, 对农业生产造成巨大损失^[12-14]。脂肪酶 *Gibberella Zeae* Lipase (以下简称 GZEL) 是由该菌分泌的一种参与宿主感染的胞外酶。开展脂肪酶 GZEL 的基本酶学特性研究, 不仅为基于该酶靶点进行药物筛选以找寻降低禾谷镰孢菌致病作用的策略提供重要参考, 而且为丰富工业用脂肪酶种类提供新的资源。Lou 等人已经解析获得了 GZEL 晶体结构^[15]。本课题组在前期研究中, 分别采用乳化法和单分子层技术对重组 GZEL 脂肪酶的底物特异性、区域选择性和立体选择性进行了表征^[16]; 研究了不同环境因素对酶蛋白界面吸附动力学的影响^[17]; 此外, 还详细研究了 C 末端片段对 GZEL 比活力和界面结合性能的影响^[18,19]。然而, 以往的研究主要集中在酶蛋白基本酶学性质和结构功能关系, 尚未涉及该酶在不同表面活性剂存在条件下的催化行为。本

研究中, 通过测定脂肪酶 GZEL 在不同类型及浓度表面活性剂存在情况下酶活力的变化情况, 为进一步评估该脂肪酶的工业应用价值提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

N-月桂酰肌氨酸钠 (Sodium N-lauroylsarcosinate)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、脱氧胆酸钠 (NaTDC)、聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100)、辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (Octyl β -D-glucopyranoside)、3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (Chaps)、十四烷基三甲基溴化铵 (TTAB)、三辛酸甘油酯 (TC8)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸 (Mes)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、氯化钠 (NaCl)、大豆来源 L- α -磷脂酰胆碱均购买自 Sigma 公司; 十二烷基磺丙基甜菜碱 (Sulfobetaine 12)、苯扎氯铵 (DDBAC)、BCA 蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司; 氨苄青霉素及异丙基硫代半乳糖苷诱导剂 (IPTG) 购自 Invitrogen 公司。Ni²⁺-NTA 填料购自北京普博欣生物科技有限公司。

恒温振荡培养箱 (HYG-C 型), 江苏太仓市强乐实验设备有限公司; 落地式高速冷冻离心机 (5-21R), 上海托莫斯科学仪器有限公司; 超声破碎仪 (JY92-IIN), 宁波新芝生物科技股份有限公司; 自动电位滴定仪 (902-STAT Titrimo 型), 瑞士万通中国有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 GZEL 的表达及纯化

基于课题组前期构建的大肠杆菌 GZEL 重组表达菌株发酵制备 GZEL 酶蛋白用于后续实验^[16]。具体酶蛋白重组表达及纯化流程为: 将构建的大肠杆菌 GZEL 野生型菌株接种到 5 mL LB 液体培养基中, 添加终浓度为 100 μ g/mL 的氨苄青霉素, 于 200 r/min, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养过夜以制备发酵种子液。按 5% 接种量将种子液接种放于 500 mL 的 LB 液体培养基中, 加入终浓度为 100 μ g/mL 氨苄青霉素, 于 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 培养 2~3 h, 测量 OD₆₀₀ 达到 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.05 mM 诱导剂 IPTG。调整培养温度到

20 ℃继续发酵培养 24 h。发酵结束后,将发酵菌液离心(10000 r/min, 6 min, 4 ℃)去掉离心上清液,菌体用 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl 缓冲液(pH 8.0)重悬,超声破碎 15 min(超声 4 s, 间歇 4 s),离心(10000 r/min, 30 min),收集破碎上清,用 0.45 μm 滤膜过滤。在收集到的破碎上清液加入 Ni²⁺-NTA 填料,轻轻摇晃混匀 30 min,装入纯化用重力柱中,用 Buffer A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0)冲洗去除杂蛋白,随后用 Buffer B (含有 100~500 mM 咪唑的 Buffer A)进行梯度洗脱,收集蛋白样品。所得到的蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳检测其纯度。用 BCA 蛋白定量检测试剂盒测定其蛋白浓度。

1.2.2 不同表面活性剂存在条件下 GZEL 脂肪酶活性测定

参考 Sams 等^[20]文献中的酶活力测定方法并稍作调整。用自动电位滴定仪(902-STAT Titrino)测定脂肪酶 GZEL 在不同表面活性剂浓度下的脂肪酶活力。反应体系为在 18 mL 缓冲液(含有 150 mM NaCl、1 mM Mes 和不同浓度的表面活性剂)中加入 0.6 mL 三辛酸甘油酯,充分搅拌 5 min,转速设定为 500 r/min,反应温度控制在 37 ℃,用自动电位滴定仪滴入 NaOH (50 mM)分别调整初始 pH 值到指定 pH (2.0~11.0)。待 pH 稳定后,加入纯化的 GZEL (100 μg 酶蛋白)反应 5 min,随后将 pH 终点调整为 pH 12.0,继续反向滴定 5 min 以确保释放的所有游离脂肪酸充分解离并被 NaOH 所中和。每个初始 pH 值条件分别进行空白对照分析(无酶蛋白添加),以测定将 pH 值从初始值增加到 pH 12.0 所需的 NaOH 量。在脂肪酶存在条件下释放的总 NaOH 量中减去空白 NaOH 量即可得到脂肪酶释放游离脂肪酸所需的 NaOH 量。脂肪酶活力单位(U)对应于每分钟释放 1 μmol 脂肪酸所用酶量。活性用 U/g 表示。以酶活性损失率来表征不同表面活性剂及浓度条件下对酶蛋白催化活力的影响,具体计算公式表示为:

$$\left[\frac{\text{表面活性剂存在下酶活力} - \text{不添加任何表面活性剂的原始酶活力}}{\text{不添加任何表面活性剂的原始酶活力}} \right] \times 100\%$$

采用选择性指数(Selectivity Index, SI)来表征不同表面活性剂对两种酶活力的影响作用,选择性指数计算公式为:SI=脂肪酶活力/磷脂酶活力。

1.2.3 不同表面活性剂存在条件下 GZEL 磷脂酶活性测定

磷脂酶活性测定所用底物为来源于大豆的 L-α-磷脂酰胆碱,其他操作方法同 1.2.2。

1.2.4 数据处理

所有数据均平行测定三次,采用 SPSS13.0 软件对

相关数据进行分析,数据表示为“均值±标准差”,用 ANOVA 进行方差分析,采用 Duncan 法进行均数间的多重比较(显著性水平 $p < 0.05$)。采用 Origin 8.0 软件进行作图。

2 结果与讨论

2.1 重组 GZEL 酶蛋白制备

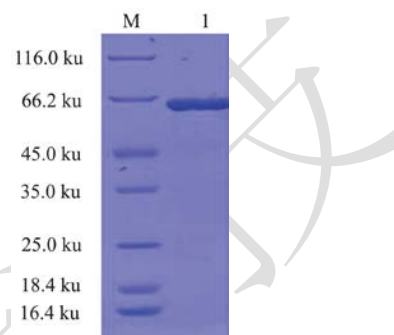


图1 重组脂肪酶 GZEL 蛋白纯化的 SDS-PAGE 结果

Fig.1 Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of purified GZEL proteins from *E. coli* SHuffle T7 cell

注: M: 蛋白 maker; 1: 野生型 GZEL。

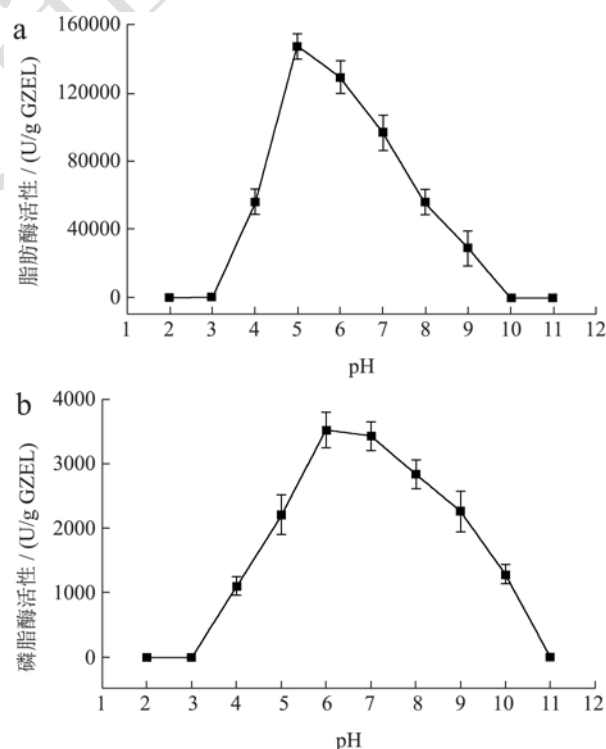


图2 GZEL 脂肪酶活性与磷脂酶活性最适反应 pH 曲线

Fig.2 Optimum pH profiles of lipase and phospholipase activity of GZEL

GZEL 野生型表达菌株经诱导发酵和蛋白纯化,最终获得电泳纯级的目的蛋白(图1),用于下一步实验。GZEL 在无任何表面活性剂条件下,以三辛酸甘

油脂为底物,测定不同 pH 条件下的脂肪酶活力。结果表明:不同 pH 条件下的脂肪酶活力呈典型的钟形曲线。脂肪酶活性在 pH=5.0 条件下最大,为 1.48×10^5 U/g;以大豆来源 L- α -磷脂酰胆碱为底物时,测得该酶在不同 pH 条件下的磷脂酶活力曲线,结果表明,在 pH=6.0 时表现出最大的磷脂酶活性,活力为 3506.94 U/g(图 2)。在无任何表面活性剂存在条件下,

脂肪酶 GZEL 的选择性指数为 42.21(表 1),该结果与之前报道的乳化法测定所得的结果相吻合(41.57)^[16]。本文测定 GZEL 发挥脂肪酶活力的最适反应 pH 与之前报道的以橄榄油乳化法反应体系测得的结果有所不同(pH 7.0)^[16]。这可能与反应体系和反应底物不同有关。

表 1 不同表面活性剂条件下 GZEL 的脂肪酶活性和磷脂酶活性

Table 1 Lipase activity and phospholipase activity of GZEL under different surfactant conditions

| 表面活性剂 | 表面活性剂浓度/mM | 磷脂酶活性/(U/g) | 脂肪酶活性/(U/g) | 选择性指数 SI | |
|-------|--|------------------------------------|--|---|--|
| 无 | 0 | 3506.94±274.47 | $(1.48 \pm 0.07) \times 10^5$ | 42.21±1.22 | |
| 阴离子型 | N-月桂酰肌氨酸钠 (sodium N-lauroylsarcosinate) | <CMC 3.0 =CMC 14.6 >CMC 18.0 | 2586.81±386.33 (-26.24%) 0 0 | $(1.26 \pm 0.08) \times 10^5$ (-14.28%) $(5.70 \pm 0.06) \times 10^4$ (-61.49%) 0 | 48.72±4.13 0 0 |
| | 十二烷基硫酸钠 (SDS) | <CMC 3.0 =CMC 8.6 >CMC 10.0 | 2417.53±255.93 (-31.06%) 0 0 | $(1.19 \pm 0.07) \times 10^5$ (-19.05%) 0 0 | 49.23±1.94 0 0 |
| | 脱氧胆酸钠 (NaTDC) | <CMC 0.5 =CMC 1.0 >CMC 4.0 | 3767.36±242.32 (+7.44%) 2196.18±260.53 (-37.36%) 0 | $(9.72 \pm 0.07) \times 10^4$ (-34.01%) $(8.42 \pm 0.06) \times 10^4$ (-43.24%) 0 | 25.81±0.06 38.34±1.81 0 |
| 阳离子型 | 苯扎氯铵(DDBAC) | <CMC 0.1 =CMC 0.39 >CMC 5.0 | 2591.15±163.15 (-26.10%) 0 0 | $(5.92 \pm 0.11) \times 10^4$ (-60.13%) $(4.84 \pm 0.07) \times 10^4$ (-67.57%) 0 | 22.85±0.99 0 0 |
| | 十四烷基三甲基溴化铵 (TTAB) | <CMC 0.1 =CMC 0.5 >CMC 5.0 | 3324.65±273.54 (-5.19%) 1940.10±222.12 (-44.67%) 0 | $(9.89 \pm 0.06) \times 10^4$ (-33.18%) $(5.40 \pm 0.08) \times 10^4$ (-63.51%) 0 | 29.75±0.52 27.83±1.15 0 |
| | 非离子型 | 聚乙二醇辛基苯基醚 (TritonX-100) | <CMC 0.05 =CMC 0.1 >CMC 0.2 | 3511.28±338.12 (+0.14%) 2656.25±281.68 (-24.24%) 1788.19±378.80 (-49.01%) | $(1.42 \pm 0.10) \times 10^5$ (-4.05%) $(1.21 \pm 0.06) \times 10^5$ (-18.24%) $(8.61 \pm 0.10) \times 10^4$ (-41.89%) |
| 两性离子型 | 辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (Octyl- β -D-glucopyranoside) | <CMC 7.0 =CMC 29.0 >CMC 35.0 | 3615.45±156.97 (+3.11%) 0 0 | $(1.82 \pm 0.07) \times 10^5$ (+22.97%) 0 0 | 50.34±0.07 0 0 |
| | 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS) | <CMC 2.0 =CMC 4.0 >CMC 5.0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |
| | 十二烷基磺丙基甜菜碱 (Sulfobetaine 12) | <CMC 2.0 =CMC 4.0 >CMC 5.0 | 0 0 0 | 0 0 0 | 0 0 0 |

在本研究中,选取了常见的不同类型表面活性剂:阴离子型: N-月桂酰肌氨酸钠(Sodium N-lauroylsarcosinate)、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸钠(NaTDC);阳离子型:十四烷基三甲基溴化铵(TTAB)、苯扎氯铵(DDBAC);非离子型:聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)、辛基- β -D-吡喃葡萄

糖苷(Octyl- β -D-glucopyranoside);两性离子型:3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐(CHAPS)、十二烷基磺丙基甜菜碱(Sulfobetaine 12)作为代表。同时每种表面活性剂参照其各自临界胶束浓度值选取三种不同浓度(<CMC, =CMC, >CMC)来测定不同表面活性剂浓度条件下脂肪酶GZEL在不同pH(2.0~11.0)

下对应脂肪酶活力和磷脂酶活力。结果如表 1 所示。

2.2 不同阴离子表面活性剂对 GZEL 催化特性影响

脂肪酶活性影响

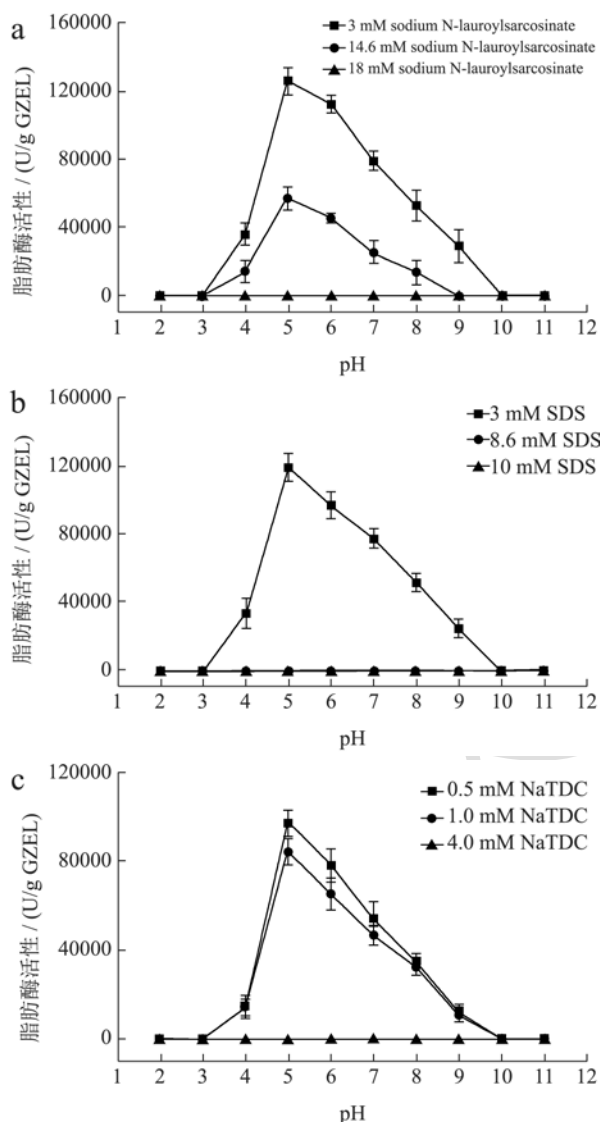


图 3 阴离子型表面活性剂对 GZEL 脂肪酶活性的影响

Fig.3 Effect of anionic surfactants on the lipase activity of GZEL

与无任何表面活性剂存在条件下测得脂肪酶 GZEL 的最适 pH 结果相同，在阴离子型表面活性剂（N-月桂酰肌氨酸钠、SDS、NaTDC）存在情况下，GZEL 发挥脂肪酶活力的最适 pH 仍 5.0(图 3)。然而，相比于无任何表面活性剂条件，所测得的脂肪酶活力均显著降低 ($p < 0.05$)。不同浓度条件下的测定结果显示，在低于其各自临界胶束浓度条件下，GZEL 仍保留一定脂肪酶活力分别为 1.26×10^5 U/g、 1.19×10^5 U/g、 9.72×10^4 U/g，酶活性损失率分别为 14.28%、19.05%、34.01%。随着表面活性剂浓度升高，当达到临界胶束

浓度时，脂肪酶活力进一步丧失（尤其是 SDS，在临界胶束浓度条件下无脂肪酶活性）。高于其各自临界胶束浓度条件下，均无法测得该酶的脂肪酶活性(图 3)。就所选择的三种阴离子表面活性剂而言，在低于其各自 CMC 条件下，N-月桂酰肌氨酸钠和 SDS 对脂肪酶活性的影响无显著性差异 ($p > 0.05$)，而 NaTDC 对脂肪酶活性的影响最大，相比于 N-月桂酰肌氨酸钠和 SDS，NaTDC 的存在导致酶活力显著降低 ($p < 0.05$)。当酶蛋白添加到阴离子表面活性剂溶液中时，阴离子表面活性剂可与酶结合形成复合物，影响了酶与底物的结合。当加入超过 CMC 值浓度的阴离子表面活性剂时，脂肪酶活力完全丧失。这可能是由于胶束的形成会影响酶与底物结合，进而影响酶活性。

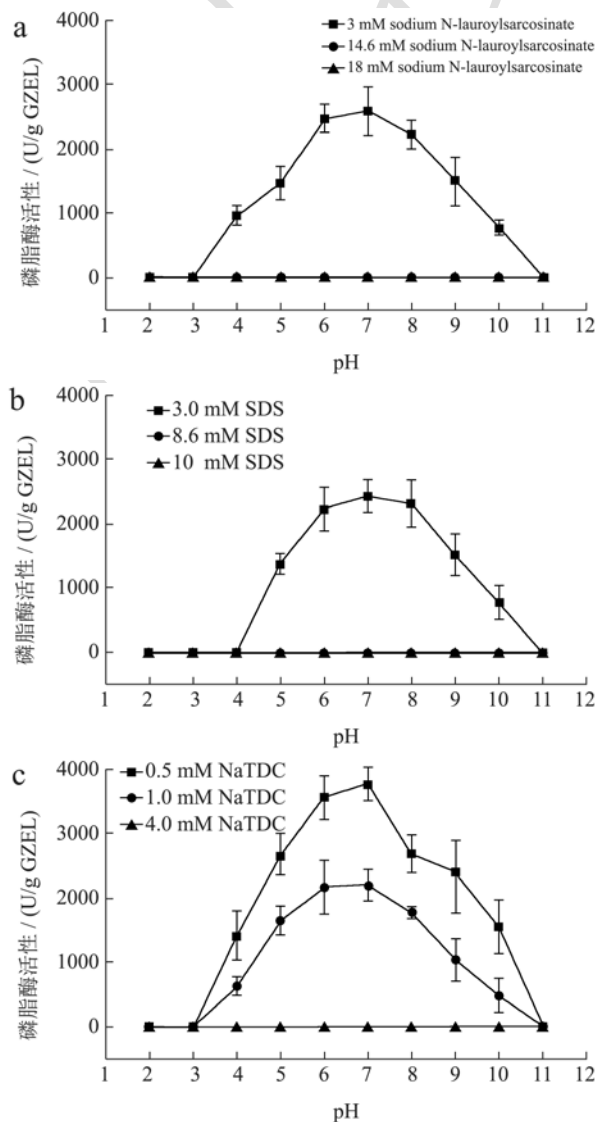


图 4 阴离子型表面活性剂对 GZEL 磷脂酶活性的影响

Fig.4 Effect of anionic surfactants on the phospholipase activity of GZEL

在 N-月桂酰肌氨酸钠、SDS、NaTDC 存在情况下，GZEL 的最适磷脂酶活力由 pH 6.0 变为 pH 7.0(图

4), 在低于其各自 CMC 条件下, N-月桂酰肌氨酸钠、SDS 对 GZEL 的磷脂酶活性同样表现出具有抑制作用, 测得磷脂酶活力分别为 2586.81 U/g 和 2417.53 U/g, 相比于无任何表面活性剂条件下测得的酶活力均显著降低 ($p < 0.05$), 酶活性损失率分别为 26.24%、31.06% (图 4), 但两者之间对于酶活力造成的影响则无显著性差异 ($p > 0.05$)。NaTDC 在低于 CMC 的浓度下, 对磷脂酶活性则起到了一定促进作用, 相比于无任何表面活性剂条件下提高了 7.44% 但酶活力差异并不显著 ($p > 0.05$)。当加入超过 CMC 值浓度的阴离子表面活性剂时, GZEL 的磷脂酶活力则完全丧失。同一个酶分子与表面活性剂结合的数目将增多, 导致表面活性剂与酶分子的作用太强, 进而破坏酶的活性。

本研究引入选择性指数 (即脂肪酶与磷脂酶活力的比值) 来进一步评估表面活性剂对该酶的脂肪酶活性和磷脂酶活性影响程度。对于 N-月桂酰肌氨酸钠、SDS 和 NaTDC, 在低于临界胶束浓度条件下测得该酶的选择性指数分别为 48.72、49.23、25.81, 与无任何表面活性剂条件下测得的选择性指数相比 42.21, N-月桂酰肌氨酸钠和 SDS 条件下的选择性指数显著上升 ($p < 0.05$), 原因在于这两种表面活性剂主要影响 GZEL 的磷脂酶活性; 而 NaTDC 的选择性指数则显著降低 ($p < 0.05$), 主要由于脂肪酶活性降低所导致。同一类型表面活性剂对脂肪酶活性的影响方向和程度并非完全一致。这种影响与具体的酶蛋白分子结构有关, 也与环境条件相关, 需要结合工业应用需求的具体环境因素深入研究。

2.3 不同阳离子表面活性剂对 GZEL 催化特性影响

在阳离子型表面活性剂十四烷基三甲基溴化铵 (TTAB) 和苯扎氯铵 (DDBAC) 存在条件下, GZEL 发挥脂肪酶活力的最适 pH 仍为 5.0。低于临界胶束浓度条件下测得的最大脂肪酶活力分别为 9.89×10^4 U/g、 $5.92 \pm 0.11 \times 10^4$ U/g, 酶活性损失率分别为 33.18% 和 60.13%, 随着表面活性剂浓度提高, 脂肪酶活力进一步损失 (损失率分别为 63.51% 和 67.57%) (图 5)。这可能是由于 GEZL 的最适 pH 为酸性, 在酸性介质中阳离子型表面活性剂才具有良好的表面活性; 而在碱性介质中容易析出而失去表面活性, 因此在酸性环境下对 GZEL 酶活性影响更大。唐庆芸等^[21]在对嗜碱性耐热脂肪酶 T1 的研究也得出类似结论。

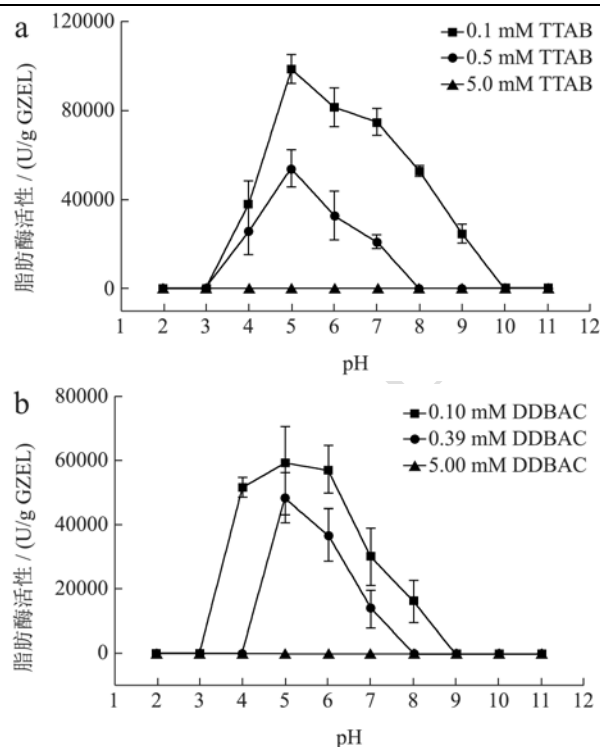


图5 阳离子型表面活性剂对 GZEL 脂肪酶活性的影响

Fig.5 Effect of cationic surfactants on the lipase activity of GZEL

不同阳离子型表面活性剂条件对 GZEL 磷脂酶活性发挥也表现较大影响, 对于十四烷基三甲基溴化铵, 随着浓度增加, 磷脂酶活力持续降低。在低于临界胶束浓度条件下 (0.1 mM), GZEL 最大磷脂酶活力稍有降低 3324.65 U/g, 损失率仅为 5.19%, 与无任何表面活性剂条件下的酶活力相比没有显著性差异 ($p > 0.05$), 当浓度增大到临界胶束浓度时 (0.5 mM), 磷脂酶活力损失率则高达 44.67%, 高于临界浓度时 (5.0 mM), 磷脂酶活力则彻底丧失。对于阳离子表面活性剂苯扎氯铵, 在低于临界胶束浓度条件下 (0.1 mM), 此时 GZEL 发挥磷脂酶活力的最适 pH 由原来的 6.0 变为 7.0, 磷脂酶活性损失率为 26.10%。在等于或大于其临界胶束浓度条件下则观察不到相应的磷脂酶活性。

对于十四烷基三甲基溴化铵 (TTAB) 和苯扎氯铵 (DDBAC), 在低于其各自临界胶束浓度条件下, 测得 GZEL 的选择性指数 SI 变为 29.75 和 22.85, 与无任何表面活性剂条件下测得的选择性指数相比均显著降低 ($p < 0.05$), 表明阳离子型表面活性剂对 GZEL 脂肪酶活性的影响远远大于对其磷脂酶活性的影响 (图 6)。这可能是由于 GEZL 的最适磷脂酶 pH 为中性, 此时阴离子表面活性剂的表面活性不如在酸性介

水中容易释放，因此对酶的抑制作用有所减弱。

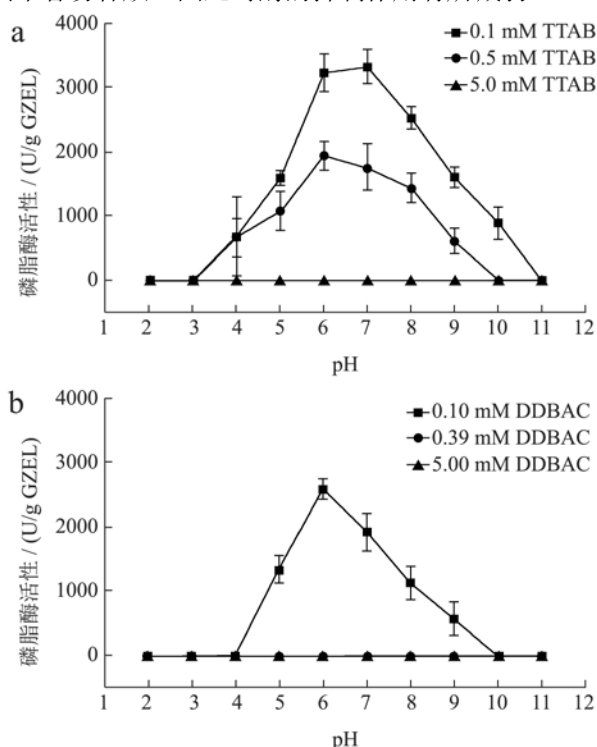


图6 阳离子型表面活性剂对 GZEL 磷脂酶活性的影响

Fig.6 Effect of cationic surfactants on the phospholipase activity of GZEL

2.4 不同非离子表面活性剂对 GZEL 催化特性影响

在非离子型表面活性剂 TritonX-100 和辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷存在情况下，GZEL 发挥脂肪酶活性的最适 pH 有所改变，均由原来的 5.0 变为 6.0。此外，不同非离子表面活性剂对脂肪酶活力的发挥起不同的影响作用。对于 TritonX-100，随着表面活性剂浓度升高，GZEL 的脂肪酶活力呈逐渐下降趋势。在低于临界胶束浓度条件下 (0.05 mM)，脂肪酶活力较无表面活性剂条件下测得脂肪酶活力并无显著降低 ($p>0.05$)，酶活力损失率仅为 4.05%，当达到其临界胶束浓度时，脂肪酶活力损失率增大到 18.24%。随着表面活性剂浓度超过其临界胶束浓度，尽管损失率达到 41.89%，但相比于其它条件，酶蛋白仍表现出一定的脂肪酶活力。相反的，GZEL 在等于或高于辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷临界胶束浓度条件下均无脂肪酶活性。而在低于辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷的浓度条件下 (7.0 mM)，脂肪酶达到了 1.82×10^5 U/g，与原始酶活相比，酶活力显著提高 ($p<0.05$)，相比于无任何表面活性剂存在条件下脂肪酶活力提高了 22.97%，表现出对酶蛋白起了一定激活作用 (图 7)。非离子表面活性剂与酶

分子之间仅存在氢键和疏水作用，抑制性较弱。合适的表面活性剂对底物而言，是乳化剂；对酶而言，又是“激活剂”^[22]。

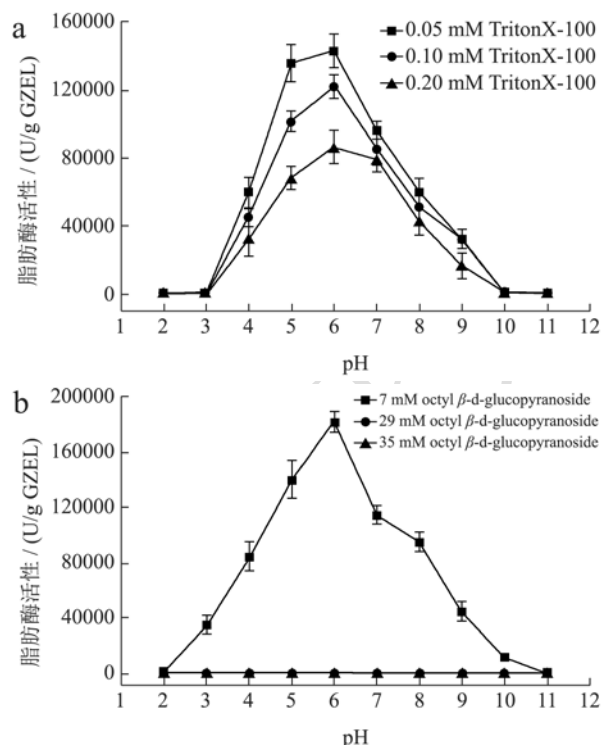


图7 非离子型表面活性剂对 GZEL 脂肪酶活性的影响

Fig.7 Effect of nonionic surfactants on the lipase activity of GZEL

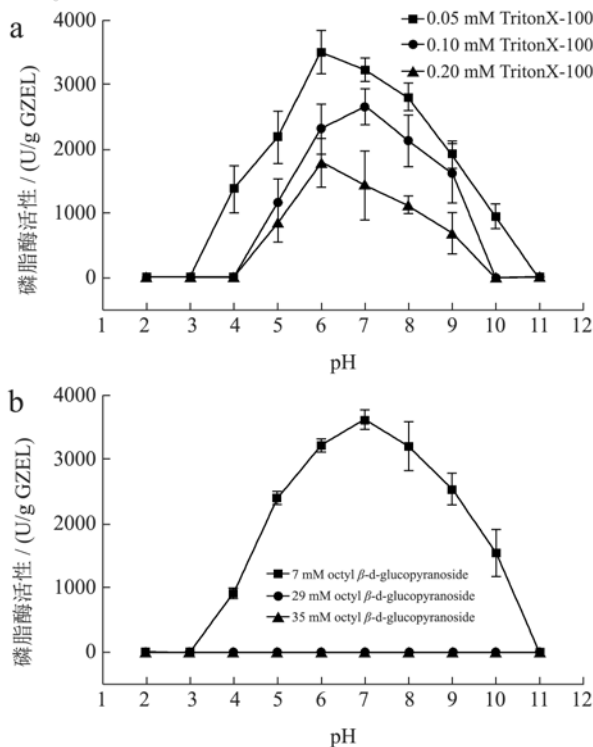


图8 非离子型表面活性剂对 GZEL 磷脂酶活性的影响

Fig.8 Effect of nonionic surfactants on the phospholipase activity of GZEL

不同非离子型表面活性剂对 GZEL 的磷脂酶活力表现出与脂肪酶活力相同的趋势。随着 TritonX-100 浓度升高, 磷脂酶活力呈现持续下降趋势。在低于和高于 TritonX-100 临界胶束浓度条件下, 测得 GZEL 的磷脂酶活力最适反应 pH 为 6.0, 然而, 在等于临界胶束浓度条件下, 其最适磷脂酶活力则为 7.0 (图 8)。与对脂肪酶活力的影响趋势相同, 低浓度的辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷对 GZEL 的磷脂酶活力也起到激活作用 (磷脂酶活力提高了 3.11%), 继续增加表面活性剂浓度则无法观察到磷脂酶活力。对于非离子型表面活性剂 TritonX-100 和辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷而言, 在低于其各自临界胶束浓度条件下, GZEL 的选择性指数 SI 分别 40.44 和 50.34。其中, TritonX-100 的选择性指数 SI 没有显著变化 ($p>0.05$), 而辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷的选择性指数 SI 明显增大 ($p<0.05$), 这说明其对 GZEL 脂肪酶活性的影响更为显著。

2.5 不同两性表面活性剂对 GZEL 催化特性影响

本研究选取 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、十二烷基磺丙基甜菜碱 (Sulfobetaine 12) 作为两性离子型表面活性剂代表。结果表明: 两性离子表面活性剂的加入, 对 GZEL 的酶活力有较大影响, 即使是加入小于 CMC 浓度的表面活性剂, 都会使其酶活力完全丧失。这可能是因为两性离子表面活性剂兼有阴离子和阳离子的特性, 两者共同作用。两性离子能与酶形成更多类型的复合物, 其对酶活力的作用机理将更为复杂。

3 结论

不同类型及浓度的表面活性剂对脂肪酶 GZEL 的酶活力表现影响不同。表面活性剂对酶的影响在很大程度上取决于两者之间离子作用力的强弱, 非离子型表面活性剂 (TritonX-100 和辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷) 在低于其临界胶束浓度条件下对于 GZEL 的脂肪酶活力和磷脂酶活力发挥起到一定激活作用; 阴离子和阳离子型表面活性剂对酶活力起到抑制作用, 并且随着浓度增加抑制作用呈现逐渐增大趋势。脂肪酶 GZEL 在两性离子型表面活性剂 (CHAPS, Sulfobetaine 12) 存在条件下, 活性完全丧失, 这可能是因为两性离子表面活性剂兼有阴离子和阳离子的特性, 对脂肪酶 GZEL 产生更大影响。此外, 不同类型及浓度的表面活性剂对脂肪酶 GZEL 其脂肪酶活性及磷脂酶活性发挥的影响作用不同, 进一步提示在针对该酶的具体应用过程

中, 应理性选择表面活性剂的种类及浓度参数。后续研究可通过分子改造等技术筛选表面活性剂耐受程度更高的酶蛋白突变体, 或通过添加酶稳定剂等方式提高 GZEL 的应用潜力。

参考文献

- [1] 周晓云,包广粮,钟卫鸿.脂肪酶在表面活性剂介质中的催化反应动力学研究[J].浙江工业大学学报,2000,28(1):18-23
ZHOU Xiao-yun, BAO Guang-liang, ZHONG Wei-hong. Study on the kinetics of lipase catalytic reaction in surfactant medium [J]. Journal of Zhejiang University of Technology, 2000, 28(1): 18-23
- [2] Xia J, Chen X, Nnanna I A. Activity and stability of *Penicillium cyclopium* lipase in surfactant and detergent solutions [J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73(1): 115-120
- [3] 坂口博修.脂肪酶在洗涤剂中的应用[J].日用化学工业译丛, 1990,2:11-16
Sakuchi Boshi. The application of lipase in detergents [J]. Journal of Daily Chemical Industry, 1990, 2: 11-16
- [4] Fujii T.脂肪分解酶在去污应用方面的研究(一)[J].日用化学工业译丛,1987,3:11-15
Fujii T. Study on the application of lipolytic enzyme in decontamination (I) [J]. Journal of Daily Chemical Industry, 1987, 3: 11-15
- [5] Fujii T.脂肪分解酶在去污应用方面的研究(二) [J].日用化学工业译丛,1987,4:17-22
Fujii T. Study on the Application of lipolytic enzyme in decontamination (2) [J]. Journal of Daily Chemical Industry, 1987, 4: 17-22
- [6] 王燕,潘华.我国洗涤用品工业发展与酶制剂应用浅析[J].中国洗涤用品工业,2009,5:40-45
WANG Yan, PAN Hua. Analysis on the development of china's detergent industry and the application of enzyme preparation [J]. China's Detergent Industry, 2009, 5: 40-45
- [7] 张桂菊,徐宝财.酶在表面活性剂水溶液中的稳定性研究[J].中国洗涤用品工业,2011,2:37-39
ZHANG Gui-ju, XU Bao-cai. Study on the stability of enzyme in surfactant aqueous solution [J]. China Washing Products Industry, 2011, 2: 37-39
- [8] 杨庆利,张高勇,张宝莲.新型表面活性剂、助剂与碱性蛋白酶相互作用[J].精细化工,2004,21(10):13-16
YANG Qing-li, ZHANG Gao-yong, ZHANG Bao-lian. Interaction of new surfactants, additives and alkaline protease [J]. Fine Chemicals, 2004, 21(10): 13-16
- [9] 杨庆利,杨秀全.表面活性剂对液体洗涤剂用蛋白酶储存稳

- 定性的影响[J].日用化学工业,2005,35(5):296-298
- YANG Qing-li, YANG Xiu-quan. Effect of surfactant on storage stability of protease for liquid detergent [J]. Daily Chemical Industry, 2005, 35(5): 296-298
- [10] 张艳红,张强,岳淑宁,等.表面活性剂对去血清复合酶中蛋白酶活性的影响[J].应用化工,2009,38(1):52-54
- ZHANG Yan-hong, ZHANG Qiang, YUE Shu-ning, et al. Effect of surfactants on protease activity in degreasing complex enzyme [J]. Applied Chemistry, 2009, 38(1): 52-54
- [11] Aloulou A, Puccinelli D, Caro A D, et al. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity [J]. Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids, 2007, 1771(12): 1446-1456
- [12] Desjardins A, Proctor H, Bairoch A, et al. Reduced virulence of trichothecene nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests [J]. Mol. Plant Microbe Interact, 1996, 9: 775-781
- [13] McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact [J]. Plant Disease, 1997, 81(12): 1340-1348
- [14] Nganje W, Bangsund D, Leistriz F, et al. Regional economic impacts of Fusarium head blight in wheat and barley [J]. Review of Agricultural Economics, 2004, 26(3): 332-347
- [15] Lou Z, Li M, Sun Y, et al. Crystal structure of a secreted lipase from *Gibberella Zeae* reveals a novel "double-lock" mechanism [J]. Protein & Cell, 2010, 1(8): 760-770
- [16] Fanghua W, Hui Z, Zexin Z, et al. Recombinant lipase from *Gibberella Zeae* exhibits broad substrate specificity: a comparative study on emulsified and monomolecular substrate [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(7): 1535
- [17] Fanghua W, Wuchong C, Abousalham A, et al. Exploring the influence of phospholipid monolayer conformation and environmental conditions on the interfacial binding of *Gibberella zeae* lipase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 1051-1056
- [18] Fanghua W, Hui Z, Anna C, et al. Function of C-terminal peptides on enzymatic and interfacial adsorption properties of lipase from, *Gibberella zeae* [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2018, 1862(12): 2623-2631
- [19] 王方华,陈吴翀,魏瑞霞,等.脂肪酶 GZEL 及其 C-端截断突变体对磷脂单分子膜的吸附动力学研究[J].现代食品科技, 2019,35(3):32-38
- WANG Fang-hua, CHEN Wu-chong, WEI Rui-xia, et al. Adsorption kinetics of lipase GZEL and its C-terminal truncated mutant on phospholipid monolayers [J]. Modern Food Science & Technology, 2019, 35(3): 32-38
- [20] Sams L, Amara S, Chakroun A, et al. Constitutive expression of human gastric lipase in, *Pichia pastoris*, and site-directed mutagenesis of key lid-stabilizing residues [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2017, 1862(10): 1025-1034
- [21] 唐庆芸,王永华.表面活性剂对 T1 脂肪酶活力的影响[J].现代食品科技,2017,3:179-183
- TANG Qing-yun, WANG Yong-hua. Effect of surfactants on T1 lipase activity [J]. Modern Food Science & Technology, 2017, 3: 179-183
- [22] Mozaffar Z, Weete J D, Dute R. Influence of surfactants on an extracellular lipase from *Phythium ultimum* [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1994, 71(3): 346-346

(上接第 346 页)

- [25] 陈传燕.稀土—药物配合物荧光探针新体系的建立及其分析应用[D].济南:山东大学,2009
- CHEN Chuan-yan. The establishment of rare earth-medicine coordination compounds fluorescence probe systems and their analytical applications [D]. Jinan: Shangdong University, 2009
- [26] 陈春涛,马庆一,高玉美,等.花生壳中木犀草素等抑菌活性成分的提取、纯化与研究[J].食品科学,2003,24(5):84-88
- CHEN Chun-tao, MA Qing-yi, GAO Mei-yu, et al. Study on extraction, purification and antimicrobial activity investigation of luteolin and other components in peanut hulls [J]. Food Science, 2003, 24(5): 84-88