

米糠耐热脂肪酶的提取及粗酶特性初探

刘春伶^{1,2}, 潘碧晖², 邓媛元², 钟立煌², 张雁², 唐小俊², 周鹏飞², 张名位^{1,2}, 刘光^{2*}
(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 米糠脂肪酶使米糠发生酸败, 常规热处理方法难以完全灭活米糠内源脂肪酶。为评价米糠中耐热脂肪酶的存在, 该研究以湿热稳定化处理的米糠为原料, 考察表面活性剂类型及浓度对米糠粗酶液脂肪酶活性影响, 进一步比较两种脂肪酶特性, 曲拉通-磷酸盐米糠脂肪酶 (TRBL) 和磷酸盐米糠脂肪酶 (PRBL)。采用 10 mmol/L 表面活性剂提取粗酶液脂肪酶活性显著升高, 其中曲拉通组效果最优。对比 TRBL 和 PRBL 性质发现, PRBL 最适反应温度和 pH 值分别为 30 °C 和 7.0; 而 TRBL 最适反应温度超过 100 °C, 且具有较好耐热性, 其最适反应 pH 值为 3.0 和 7.0; 两种粗酶液脂肪酶水解不同碳链的底物无显著特异性; Ba²⁺ 和 Zn²⁺ 都能激活粗酶液脂肪酶活性, 但 Ba²⁺ 对 TRBL 脂肪酶活性激活作用远高于 PRBL 组; K⁺ 和 Fe³⁺ 分别对 PRBL 和 TRBL 脂肪酶活性具有最大抑制作用; 相比于 PRBL, TRBL 具有更好的有机溶剂耐受性, 且甲醇对 TRBL 脂肪酶活性具有激活作用。研究证明了稳定化米糠中存在能耐受温度和有机溶剂的脂肪酶, 为深入挖掘新型米糠脂肪酶提供了理论依据。

关键词: 米糠; 脂肪酶; 表面活性剂; 酶学特性

文章编号: 1673-9078(2024)10-173-180

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.10.1002

Extraction of Heat-resistant Lipase from Rice Bran and Preliminary Investigation on the Characteristics of Crude Enzyme

LIU Chunling^{1,2}, PAN Bihui², DENG Yuanyuan², ZHONG Lihuang², ZHANG Yan², TANG Xiaojun²,
ZHOU Pengfei², ZHANG Mingwei^{1,2}, LIU Guang^{2*}

(1. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)
(2. Sericulture & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: Rice bran lipase can make rice bran go rancid, and conventional heat treatment methods are difficult to completely inactivate endogenous lipase in rice bran. In order to evaluate the presence of heat-resistant lipase in rice bran, the present study was carried out to investigate the effects of surfactant type and concentration on the lipase activity of rice

引文格式:

刘春伶, 潘碧晖, 邓媛元, 等. 米糠耐热脂肪酶的提取及粗酶特性初探[J]. 现代食品科技, 2024, 40(10): 173-180.

LIU Chunling, PAN Bihui, DENG Yuanyuan, et al. Extraction of heat-resistant lipase from rice bran and preliminary investigation on the characteristics of crude enzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(10): 173-180.

收稿日期: 2023-08-24

基金项目: 广东省重点研发计划项目 (2020B020225004); 广东省自然科学基金项目 (2023A1515030242; 2021A1515010888); 广东省农业科学院创新基金产业专项 (202229); 广东特支计划项目 (2019BT02N112); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目 (2023KJ117); 广东省财政厅专项 (粤财农 (2022) 167 号); 广东省农业科学院科技创新战略专项基金 (R2023PY-JX018)

作者简介: 刘春伶 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 1499309727@qq.com

通讯作者: 刘光 (1988-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 谷物加工, E-mail: liuguang@gdaas.cn

bran's crude enzyme solution using the rice bran stabilized by the wet heat treatment as the raw material, and further compare the characteristics of the two lipases, Triton x-100 rice bran lipase (TRBL) and phosphate rice bran lipase (PRBL). The lipase activity of the crude enzyme solution extracted with 10 mmol/L surfactant increased significantly, with the Triton x-100 group exhibiting the best effect. Comparison on the properties of TRBL and PRBL revealed that the optimal reaction temperature and pH of PRBL were 30 °C and 7.0, respectively, whilst the optimal reaction temperature of TRBL was over 100 °C and it had good heat resistance, with the optimal reaction pH of being 3.0 and 7.0; The two crude liquid lipases had no significant specificity in the hydrolysis of substrates with different carbon chains; Ba²⁺ and Zn²⁺ could activate the lipase activity of the crude liquid enzymes, but the activation effect of Ba²⁺ on the activity of TRBL was much higher than that of the PRBL group. K⁺ and Fe³⁺ had the greatest inhibitory effect on the lipase activities of PRBL and TRBL, respectively; TRBL had better tolerance to organic solvents than PRBL, and methanol had an activating effect on TRBL's lipase activity. The study proved that there were lipases that could tolerate temperature and organic solvents in stabilized rice bran, which provides a theoretical basis for in-depth exploration of novel rice bran lipases.

Key words: rice bran; lipase; surfactant; enzymatic properties

米糠是稻谷加工副产物，年产量约 1 200 万 t。米糠营养丰富，其包含蛋白质、粗纤维、脂肪^[1-4]，以及 γ - 谷维素^[5-8]。目前我国米糠多用作动物饲料，高值化加工占比低，仅为 15%，这造成了极大的副产物资源浪费^[9]。

米糠保藏过程中易发生酸败变质，影响了其高值化利用^[10,11]。米糠中不仅含有十分丰富的油脂而且还含有高活性的内源脂肪酶，酶会在其中产生作用，油脂迅速分解成游离脂肪酸，导致米糠的酸价上升，氧化变质。灭活米糠内源脂肪酶是延缓米糠变质的有效手段，目前，热处理被认为具有较好的灭活米糠脂肪酶的效率。Yu 等^[12]比较了 11 种处理方式对米糠稳定化进行处理，发现热处理方式最佳，其中湿热处理法（121 °C，20 min）具有最高的米糠脂肪酶灭活效率，稳定化米糠残余脂肪酶活性仅为 10.73%。但同时也反映出，即便 121 °C 的高温也难以完全灭活米糠脂肪酶，意味着米糠中可能存在耐热性较好的脂肪酶。

目前，关于米糠脂肪酶的分离鉴定已有系列报道。例如，Yu 等^[13]从米糠中分离得到脂肪酶，其最适温度为 40 °C，最适 pH 值为 7.5，且该酶在低于 50 °C，pH 值在 7.0~7.5 时具有良好的稳定性。Chen 等^[14]从米糠中提取出来两种新型的脂肪酶，其脂肪酶 I 的最适反应温度为 35 °C，脂肪酶 II 的最适反应温度为 50 °C。Yasuo 等^[15]分离的米糠脂肪酶，其最适反应温度为 27 °C，该酶较稳定时的 pH 值范围为 5.0~9.5，温度为 30 °C。Bhardwaj 等^[16]从米糠中分离的米糠脂肪酶，其最适反应温度达 80 °C。目前，分析对已有研究报道的米糠脂肪酶分析发现，其最

适反应温度不超过 80 °C，对于高温米糠脂肪酶的研究未见报道。脂肪酶的本质是蛋白质，理论上 121 °C 的高温处理足以使大多数脂肪酶变性失活，然而 121 °C 高温处理后的米糠中仍残留约 10% 的脂肪酶活性，这提示米糠中可能存在尚未被发现且耐热性良好的脂肪酶。近期，Yu 等^[17]研究发现，使用纤维素酶水解米糠能够提高米糠脂肪酶活性，证明米糠中存在结合态脂肪酶，因此，项目组推测米糠耐热脂肪酶可能也是以结合态形式存在，故尚未被研究报道。

基于此，本研究拟以湿热处理的稳定化米糠为原料，通过不同溶剂从稳定化米糠原料中提取粗酶液，并对其酶学特性进行评价，以期明确其耐热性质，研究结果为丰富米糠内源脂肪酶学术内涵奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

新鲜米糠，购于广东海纳农业有限公司；考马斯亮蓝（G250）溶液，Biosharp 公司；4- 硝基苯基月桂酸酯（pNPL），美国 Sigma 公司；其余试剂均为分析纯，购于天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

YZM-M60X70BI 脉动真空压力蒸汽灭菌器，广州市豪尔生医疗设备有限公司；Tecan GENios 酶标仪，瑞士 Tecan 有限公司；PB-10 精密 pH 计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；PH-030A 干燥箱，上海一恒科学仪器有限公司；BLH-3500（降温型）全自动精米机，日本凯特公司。

1.3 方法

1.3.1 米糠稳定化

将新鲜的米糠于 121 °C 湿热蒸汽下处理 1 min, 得到稳定化的米糠, 然后将米糠经粉碎机进行粉碎, 粉碎过后继续过 40 目筛, 混匀, 最后将米糠储存于 -80 °C 备用。

1.3.2 米糠粗酶液提取

1.3.2.1 不同的表面活性剂对米糠粗酶液的提取

选择曲拉通 X-100、SDS 和 CTAB 等三种表面活性剂对米糠脂肪酶进行提取, 将三种不同类型的表面活性剂添加到 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 配置成 1、5 和 10 mmol/L 的表面活性剂磷酸盐缓冲液, 并按照下述方法对米糠粗酶液进行提取: 准确称量 2.00 g 米糠, 分别加入 10 mL 上述缓冲液, 混匀, 将其置于磁力搅拌器中以 120 r/min 的转速搅拌提取 40 min。随后, 在离心机中以 8 000 r/min 的转速离心 10 min, 收集上清液, 并用 10 kDa 超滤离心管进一步浓缩获得不同提取液, 随后对提取液进行脂肪酶活性测定, 确定合适的表面活性剂类型及浓度。

1.3.2.2 缓冲液及曲拉通对米糠粗酶液的提取

采用 0.1 mol/L pH 值 7.0 的磷酸钠缓冲液和 0.1 mol/L pH 值 7.0 的磷酸钠缓冲液 (含 10 mmol/L 曲拉通缓冲溶液) 按照 1.3.2.1 所述方法提取米糠脂肪酶粗酶液, 分别获得磷酸盐曲拉通提取粗酶液 (TRBL, Triton x-100 Rice Bran Lipase) 和磷酸盐提取粗酶液 (PRBL, Phosphate Rice Bran Lipase), 置于 4 °C 冰箱备用。

1.3.3 米糠粗酶液脂肪酶活性的测定

参考相关文献^[18,19]的方法, 粗酶溶液的脂肪酶活性的测定采用 4- 硝基苯酚 (*p*NP, P-nitrophenol) 法, 并稍作改动。分别配制溶液 A: 0.10 g 4- 硝基苯基月桂酸酯 (*p*NPL, 4-Nitrophenyl Laurate) 溶于 30 mL 异丙醇; 溶液 B: 0.40 g 曲拉通 X-100、0.10 g 阿拉伯树胶溶于 90 mL pH 值 7.0 磷酸盐缓冲液。取 0.40 mL A 液与 6.00 mL B 液混合均匀后加入 0.40 mL 粗酶液于 35 °C 水浴反应 40 min, 冰浴 2 min, 随后, 4 °C 下 8 000 r/min 离心 5 min, 最后取上清液于 410 nm 测定吸光值。取另一份米糠粗酶液于沸水浴中, 灭酶 20 min 后进行如上操作作为空白。采用 *p*NP 制作标准曲线, 一个脂肪酶活性单位被定义为每克样品每小时水解 PNPL 生成 *p*NP 的量。脂肪酶活力由

下式求得:

$$R = \frac{A_{410} \times n \times V}{k \times t \times m (1-M) \times 139.11} \times 1000 \quad (1)$$

式中:

R—脂肪酶活性, U/g;

*A*₄₁₀—样品吸光值;

n—稀释倍数;

V—反应体系的总体积, mL;

k—对硝基苯酚标准曲线斜率;

139.11—对硝基苯酚相对分子质量;

t—反应时间, h;

m—样品质量, g;

M—样品水分含量, %。

1.3.4 米糠粗酶液脂肪酶性质测定

1.3.4.1 最适反应温度及温度稳定性

米糠粗酶液脂肪酶最适反应温度的测定: 参照上述脂肪酶活性测定方法配制好反应体系, 并置于 20~100 °C 条件下孵育 5 min, 测定 410 nm 处吸光值, 测定粗酶液的酶活性。

米糠粗酶液脂肪酶温度稳定性的测定: 将 200 μL 粗酶液置于一定温度下孵育 1 h, 按照 1.3.3 所述方法测定脂肪酶温度稳定性。

1.3.4.2 最适反应 pH 值

选择 50 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠 (pH 值 3.0~5.0) 和 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.0~8.0) 对米糠粗酶液脂肪酶的最适反应 pH 值进行测定, 反应体系参照所述方法配制。

1.3.4.3 底物特异性

选择不同碳链长度的对硝基苯酚酯包括 C2 (4-硝基苯基乙酸酯)、C4 (4-硝基苯基丁酸酯)、C6 (4-硝基苯基己酸酯)、C8 (4-硝基苯基辛酸酯)、C10 (4-硝基苯基癸酸酯)、C12 (4-硝基苯基月桂酸酯)、C14 (4-硝基苯基肉豆蔻酸酯)、C16 (4-硝基苯基棕榈酸酯) C18 (4-硝基苯基硬脂酸酯) 评价米糠粗酶液中脂肪酶底物特异性, 参考 1.3.3 所述方法, 以不同底物替代对硝基苯酚月桂酸酯进行底物特异性测定。

1.3.4.4 金属离子耐受性

选用 CuCl₂、AlCl₃、MnSO₄、FeSO₄、FeCl₃、NaCl、KCl、MgSO₄、CaCl₂、BaCl₂、ZnSO₄ 等 11 种金属离子进行粗酶液金属离子耐受性测定, 用磷酸盐缓冲液配制 10 mmol/L 的金属离子溶液, pH 值为 7.0, 将浓度为 10 mmol/L 的金属离子溶液与粗

酶液按 1:1 (V/V) 混合均匀后在最适温度下孵育 1 h, 参照 1.3.3 所述方法测定粗酶液脂肪酶活性。以不添加金属离子溶液的组别作为对照组。

1.3.4.5 有机溶剂耐受性

选用甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇、正己烷、氯仿、丙酮、乙醚等 8 种有机溶剂进行粗酶液有机溶剂耐受性测定, 将体积分数为 30% (V/V) 的有机溶剂与粗酶液按 1:1 (V/V) 混合均匀后在最适温度下孵育 1 h, 参照 1.3.3 所述方法测定粗酶液脂肪酶活性。以不添加有机溶剂的组别作为对照组。

1.4 数据处理

本文中的指标测定均重复三次, 数据以均值 ± 标准差表示, 组间差异比较采用 SPSS 24.0 统计软件中单因素方差分析, 并进行 Duncan 检验, 显著性水平为 $P < 0.05$, 图表中不同字母表示该水平下的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 表面活性剂对米糠粗酶液中脂肪酶活性影响

豆类、玉米和小麦等谷物中存在膜结合脂肪酶, 通过表面活性剂能够提取得到^[20]。因此, 本研究选择了非离子型表面活性剂曲拉通、阴离子型表面活性剂 SDS 和阳离子型表面活性剂 CTAB 等三种典型表面活性剂从稳定化米糠中提取粗酶液, 利用磷酸盐缓冲溶液提取的粗酶液活性作为对照 100%, 其脂肪酶活性结果如图 1 所示。

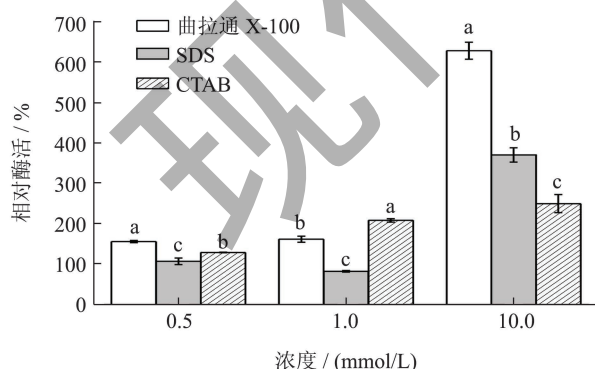


图 1 不同类型表面活性剂提取的粗酶液脂肪酶活性比较

Fig.1 Comparison of lipase activity of crude enzyme solution extracted by different types of surfactants

注: 图中同一浓度下字母完全不同时, 表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

由图 1 可见, 当表面活性剂浓度低于 1 mmol/L

时, 提取液中脂肪酶相对酶活变化表现不一, 曲拉通和 CTAB 的添加能够提高粗酶液中脂肪酶活性, 而 SDS 的添加则影响了粗酶液脂肪酶活性。继续提高表面活性剂浓度至 10 mmol/L 后发现, 三种表面活性剂提取的粗酶液其脂肪酶活性都显著提升, 其中曲拉通组提升幅度最大, 提取液中脂肪酶相对酶活性提升了 5 倍。这一结果表明, 米糠中也存在着膜结合脂肪酶, 使用 10 mmol/L 曲拉通能够提取得到最高的脂肪酶活性。O'Connor 等^[20]评价了不同表面活性剂对小麦膜结合脂肪酶活性影响, 结果发现使用曲拉通提取得到的粗酶液脂肪酶活性较高。因此, 选择 10 mmol/L 曲拉通提取的粗酶液进行后续酶学特性研究。

2.2 不同米糠粗酶液脂肪酶的最适反应温度和温度稳定性

采用曲拉通磷酸盐和磷酸盐从稳定化米糠中分别提取得到粗酶液 TRBL 和 PRBL, 对其脂肪酶最适反应温度进行了测定, 结果如图 2 所示, 由图 2a 可得, 不同缓冲液提取得到的粗酶液其脂肪酶最适反应温度差异明显, 其中, PRBL 的活性随着温度的升高呈现先升高后降低的趋势, 最适反应温度为 30 °C, 继续升高温度, 活性迅速下降, 但也未见完全失活, 100 °C 时仍残留约 30% 的相对酶活性; 而 TRBL 的活性随温度升高则呈现先升高后降低再升高的趋势, 两个波峰对应的温度分别为 30 °C 和 100 °C, 说明 TRBL 中可能存在两个以上的脂肪酶, 其中一个与 PRBL 中脂肪酶相同, 最适反应温度为 30 °C, 而另一个则表现出了较好的耐热性, 最适反应温度超过 100 °C, 且后者可能为膜结合脂肪酶, 需要使用表面活性剂才能够提取得到。对比两组粗酶液脂肪酶活性发现, TRBL 脂肪酶活性明显高于 PRBL 组, 在 100 °C、pH 值 7.0 条件下, 测得 PRBL 和 TRBL 相对酶活性分别为 28.54% 和 303.99%。进一步对两组样品进行了热稳定性分析, 由图 2b 可见, 两组粗酶液中脂肪酶随着温度升高, 其热稳定性呈现相反的趋势, 其中 TRBL 的脂肪酶随温度升高, 其相对酶活性不断提高, 在 100 °C 孵育 1 h 后, 其脂肪酶残余活性仍高达 71%, 表现出了较好的耐热性; 而 PRBL 的脂肪酶则随温度升高, 其相对酶活性总体呈现下降趋势, 耐热性远远低于 TRBL 组。

从已有文献得到, 米糠来源脂肪酶的最适反应温度通常集中在 30~50 °C 范围内^[13,14,21], Bhardwaj 等^[16]报道的米糠耐热脂肪酶的最适反应温度为

80 °C, 而更高温度的米糠耐热脂肪酶则未见报道。本研究结果发现, TRBL 脂肪酶最适反应温度超过 100 °C, 这可能与膜结合脂肪酶具有更稳定的结构有关, 100 °C 都难以使其变性失去活性。

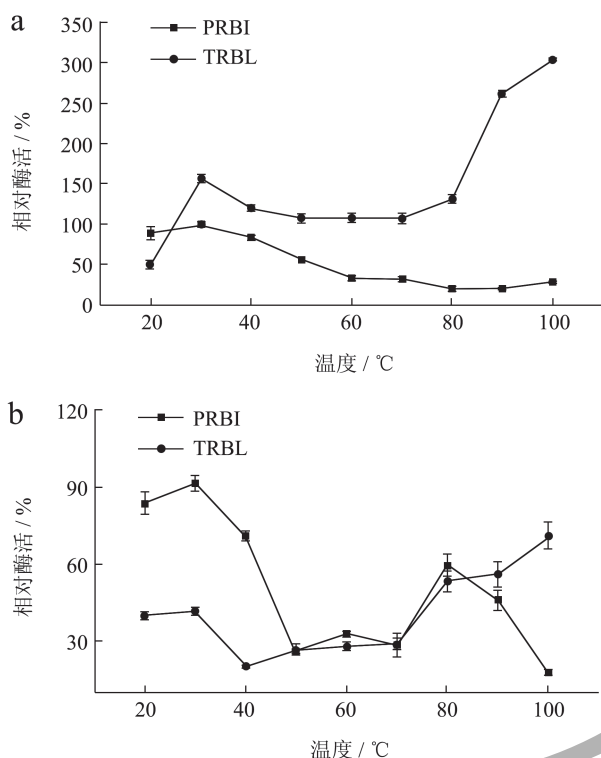


图 2 不同米糠粗酶液中脂肪酶的最适反应温度 (a) 及温度稳定性 (b) 测定

Fig.2 Determination of optimum reaction temperature (a) and thermal stability (b) of lipase in different rice bran crude enzyme solutions

2.3 不同米糠粗酶液脂肪酶的最适反应 pH 值

溶液 pH 对不同米糠粗酶液脂肪酶活性影响结果如图 3 所示, PRBL 的脂肪酶最适反应 pH 值为 7.0, 属于中性脂肪酶, 在酸性条件下活性保持较好, pH 值 3.0 时, 仍保留 50% 以上活性。余诚玮等从米糠中分离了脂肪酶, 其最适反应 pH 值为 7.5, 并且在 pH 值 7.0 及 pH 值 7.5 时最为稳定^[1]; Chen 等^[14]从米糠中提取分离得到两种脂肪酶, 脂肪酶 I 和脂肪酶 II 的最适反应 pH 值均为 7.0; Rajeshwara 等^[22]从脱脂米糠中分离脂肪酶, 其最适反应 pH 值为 7.5, 这些结果表明, 米糠脂肪酶的最适反应 pH 值一般集中在中性或弱碱性条件, 本研究 PRBL 脂肪酶最适反应 pH 值与已有研究相符。

而 TRBL 的最适反应 pH 值与 PRBL 不同, 当 pH 值低于 5.0 时, 随着 pH 值的增加其活性逐渐降低,

而当 pH 值大于 5.0 时, 则随着 pH 值增加其活性呈现逐渐升高的趋势, 也即 pH 值 5.0 时活性最低, 而 pH 值 3.0 和 pH 值 7.0~8.0 范围内表现出了较大的酶活性, 且组间无显著差异。pH 值 3.0 和 pH 值 7.0~8.0 范围内都表现出了较好的活性可能与 TRBL 中存在多个脂肪酶, 且具有不同的最适反应 pH 值有关, 这与 TRBL 最适反应温度存在两个峰的研究结果相匹配。

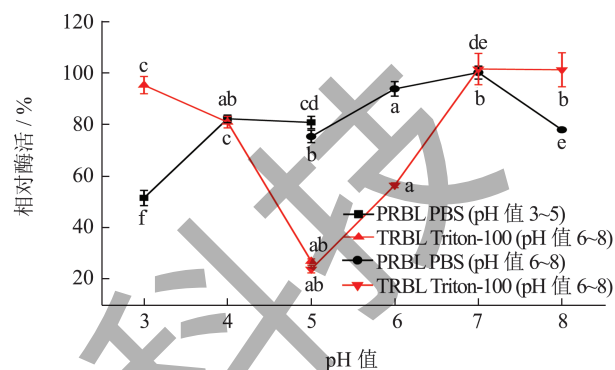


图 3 pH 值对 PRBL 和 TRBL 的脂肪酶活性影响

Fig.3 Effect of pH value on lipase activity of PRBL and TRBL

2.4 不同米糠粗酶液脂肪酶的底物特异性

不同的脂肪酶对底物具有不同的催化特异性, 而催化底物反应速率的快慢与酶和底物分子的结构相关^[23]。米糠粗酶液催化不同碳链长度的底物, 其水解活性如图 4 所示。

由图 4 可知, PRBL 和 TRBL 对不同链长的底物均具有水解能力。其中 PRBL 对碳链长度为 12 的 4- 硝基苯酚月桂酸酯的水解活性最强, 但与碳链长度为 8 的底物水解活性无显著性差异 ($P>0.05$), 而对其余碳链长度的 4- 硝基苯酯底物的水解活性均显著低于 4- 硝基苯酚月桂酸酯的水解活性, 也即 PRBL 对中链底物的水解活性相对于短链和长链底物会更突出一些。

而 TRBL 对碳链长度为 4、8、10、12 的底物具备较高的水解活性, 且四者之间无显著性差异 ($P>0.05$), 其中对 C4 (4- 硝基苯酚丁酸酯) 具有最高的水解活性, 而对其余碳链长度底物的水解活性则显著低于 4- 硝基苯酚丁酸酯和 4- 硝基苯酚月桂酸酯, 也即 TRBL 对中链和短链底物比长链底物具有更好的水解能力。两种粗酶液对不同碳链长度的 4- 硝基苯酯具有水解活性, 这可能与它们都含有较宽的底物选择性有关, 从而对所有链长的底物都具有一定的水解活性。

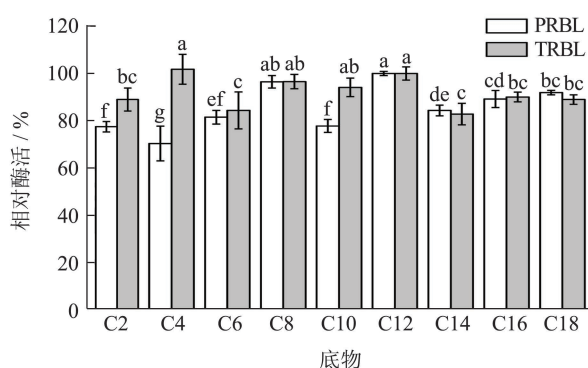


图4 PRBL 和 TRBL 脂肪酶的底物特异性

Fig.4 Substrate specificity of PRBL and TRBL lipases

注: 图中字母完全不同时, 表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.5 金属离子对不同米糠粗酶液的脂肪酶活性影响

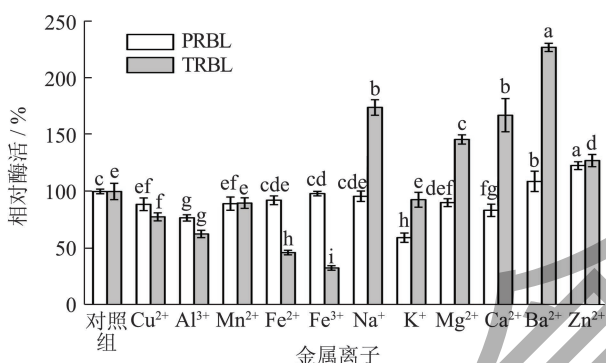


图5 金属离子对脂肪酶活性的影响

Fig.5 Effect of metal ions on lipase hydrolysis activity

注: 图中同种酶字母完全不同时, 表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

金属离子可以与脂肪酶活性位点上带负电的氨基酸残基相结合, 从而激活或者抑制酶活性^[24]。不同金属离子对米糠粗酶液的脂肪酶活性影响结果如图5所示, 由图5可见, 添加Fe²⁺、Fe³⁺、Na⁺对PRBL脂肪酶活性无显著影响, 而Cu²⁺、Al³⁺、Mn²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、K⁺对PRBL脂肪酶活性有轻微的抑制作用, 其中K⁺活性抑制作用最大, 40%的脂肪酶活性被抑制^[25], 而Ba²⁺、Zn²⁺则表现出了激活脂肪酶酶活性的作用, 其酶活性分别提高了8.91%和22.86%。张萌等^[26]从盐湖中分离得到嗜盐脂肪酶, 该脂肪酶粗酶性质研究表明, 金属离子Ba²⁺、Fe²⁺、Cu²⁺对酶具有激活作用, 酶活性也有不同程度的提高。

对于TRBL, 其脂肪酶活性在Na⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Ba²⁺、Zn²⁺存在下能够被显著激活, 其中Ba²⁺

的激活效果最佳, 其相对酶活性提高1.3倍; Cu²⁺、Al³⁺、Fe²⁺和Fe³⁺对TRBL脂肪酶具有明显抑制作用, 其中Fe³⁺对脂肪酶活性抑制作用最大, 达69%。此外, Mn²⁺、K⁺对TRBL的酶活性影响不显著。舒正玉等^[27]研究金属离子对黑曲霉F044脂肪酶的影响, 发现Ca²⁺和Mg²⁺能提高脂肪酶的活力。而Sugihara等^[28]研究发现, Zn²⁺对黑曲霉脂肪酶有显著的抑制作用, 仅保留2%的残余酶活力。也就是说, 金属离子对脂肪酶活性的影响并无一致规律性, 会伴随着脂肪酶的来源而有所差异。

金属离子对PRBL和TRBL中脂肪酶活性影响差异较大, 如Fe³⁺对PRBL无活性影响, 但却对TRBL脂肪酶活性具有最大的抑制作用; 而K⁺对TRBL脂肪酶活性基本无影响, 但对PRBL脂肪酶活性具有最大抑制作用。除了差异, 也存在相似的作用, 如Ba²⁺和Zn²⁺都能够激活两者的酶活性, 但从激活效果方面看, Ba²⁺对TRBL脂肪酶活性激活作用远远高于PRBL组。这些结果表明, 两个组分中存在着性质差异较大脂肪酶。

2.6 有机溶剂对不同米糠粗酶液的脂肪酶活性影响

脂肪酶的催化水解必须发生在油水界面上, 一些有机溶剂能够影响这种界面水解反应, 从而激活或抑制脂肪酶活性^[29]。不同有机溶剂对米糠粗酶液的脂肪酶活性影响结果如图6所示, 由图6可知, 相比于TRBL, PRBL中脂肪酶在所选的8种有机溶剂中都表现出了极大的活性抑制作用, 残留相对酶活性都不超过10%, 在丙酮影响下, 完全失去活性。

而对比于PRBL, TRBL则表现出了较好的有机溶剂耐受性, 活性不受异丙醇和丁醇影响, 且在甲醇存在下, 活性能够被轻微激活, 相对酶活提高28%; 乙醇、正己烷、氯仿、丙酮和乙醚等5种有机溶剂对TRBL脂肪酶活性有负面影响, 但影响有限, 除了丙酮和氯仿外, 其他组残留活性都超过50%。丙酮虽然是所选溶剂中对TRBL脂肪活性抑制作用最大的有机溶剂, 但相对于PRBL组, 其活性残留率仍有20%。H-Kittikun等^[30]的研究发现, 纯化的脂肪酶EQ3活性受异丙醇影响较小, 异丙醇处理后其活性仍保留80%, 但不耐受其他有机溶剂, 如在乙醇和甲醇的影响其酶活性降低至2%~8%, 几乎完全失去活性。来自蒙特利假单胞菌TKU009的脂肪酶具有较好有机溶剂耐受性, 在异丙醇、丙酮和乙醇中保留了50%~75%的活性, 在甲醇中则保

留了 80% 的活性^[31]，与本研究的脂肪酶有相似的有机溶剂耐受性

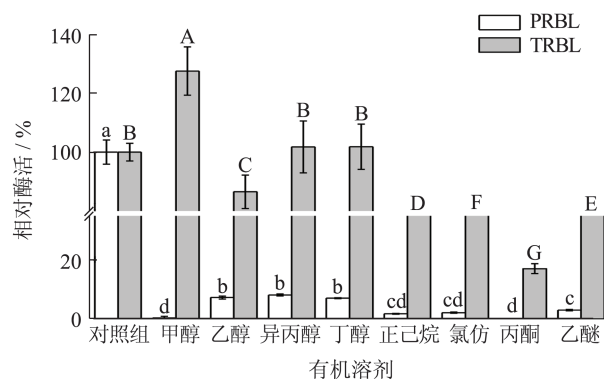


图 6 脂肪酶在有机溶剂中的耐受性

Fig.6 Stability of lipase in organic solvents

注：图中同一组中不同字母表示样品之间存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 结论

选用磷酸盐缓冲液和曲拉通磷酸盐缓冲液从稳定处理的米糠中提取得到 PRBL 和 TRBL 脂肪酶粗酶液，两种粗酶液中脂肪酶特性表现出较大差异。相比于 PRBL 组，TRBL 具有更高的最适反应温度和更好的耐热性；PRBL 脂肪酶对中链底物的水解活性较短链和长链底物更优，而 TRBL 脂肪酶则对中、短链底物更具有偏好性；5 种金属离子能够激活 TRBL 脂肪酶，而只有 Ba^{2+} 和 Zn^{2+} 两种金属离子能够同时对两个组分中脂肪酶活性具有激活作用；有机溶剂对 PRBL 脂肪酶活性影响较大，而 TRBL 则表现出较好的有机溶剂耐受性。研究结果为进一步深入挖掘新型米糠脂肪酶提供理论依据。

参考文献

[1] 余诚玮.米糠营养成分与酸败成因的分析与控制[D].南昌:南昌大学,2022.

[2] GUL K, YOUSUF B, SINGH A K, et al. Rice bran: nutritional values and its emerging potential for development of functional food-A review [J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2015, 6(1): 24-30.

[3] 吴妙鸿,黄薇,刘兰英,等.米糠营养成分分析及在鲍鱼饲料中的应用价值研究[J].粮食与饲料工业,2018,3:34-37.

[4] SAPNA I, JAYADEEP A. Influence of enzyme concentrations in enzymatic bioprocessing of red rice bran: a detailed study on nutraceutical compositions, antioxidant and human ldl oxidation inhibition properties [J]. Food Chemistry, 2021, 351: 129272.

[5] 吴一庄.米糠稳定化的研究进展[J].广东饲料,2020,29(8):44-46.

[6] WISETKOMOLMAT J, ARJIN C, SATSOOK A, et al. Comparative analysis of nutritional components and phytochemical attributes of selected thai rice bran [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 833730.

[7] SAPNA I, JAYADEEP A. Role of endoxylanase and its concentrations in enhancing the nutraceutical components and bioactivities of red rice bran [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147: 111675.

[8] OMARINI A B, LABUCKAS D, ZUNINO M P, et al. Upgrading the nutritional value of rice bran by solid-state fermentation with *Pleurotus sapidus* [J]. Fermentation, 2019, 5(2): 44.

[9] HUANG S, BENCHAMAS G, HUANG G. Whole processing and use of rice polishings [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 63: 102373.

[10] YILMAZ N, TUNCEL N B, KOCABIYIK H. Infrared stabilization of rice bran and its effects on γ -oryzanol content, tocopherols and fatty acid composition [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(8): 1568-1576.

[11] CHOI N, KIM H, KIM B H, et al. In situ lipase-catalyzed transesterification in rice bran for synthesis of fatty acid methyl ester [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 120: 140-146.

[12] YU C, HU Q, WANG H, et al. Comparison of 11 rice bran stabilization methods by analyzing lipase activities [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2020, 44(4): e14370.

[13] YU C W, ZHENG L F, CHENG M Y, et al. Purification, identification, characterization and catalytic mechanism of two lipases from rice bran (*Oryza sativa*) [J]. LWT- Food Science and Technology, 2021, 140: 110693.

[14] CHEN C C, GAO G J, KAO A L, et al. Two novel lipases purified from rice bran displaying lipolytic and esterification activities [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 298-306.

[15] AIZONO Y, FUNATSU M, FUJIKI Y, et al. Purification and characterization, of rice bran lipase II [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1976, 40(2): 317-324.

[16] BHARDWAJ K, RAJU A, RAJASEKHARAN R. Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. a new member of the (phospho) lipase family [J]. Plant Physiology, 2001, 127(4): 1728-1738.

[17] YU C, PENG B, LUO T, et al. Bound lipase: an important form of lipase in rice bran (*Oryza sativa*) [J]. Food Science and Human Wellness, 2023, 12(5): 1779-1787.

- [18] LAOKULDILOK T, RATTANATHANAN Y. Protease treatment for the stabilization of rice bran: effects on lipase activity, antioxidants, and lipid stability [J]. *Cereal Chemistry*, 2014, 91(6): 560-565.
- [19] 潘碧晖,魏振承,邓媛元,等. 高温高压蒸汽处理对米糠理化及营养特性的影响[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 143-152.
- [20] O'CONNOR HARWOOD J L. Solubilization and purification of membrane-bound lipases from wheat flour [J]. *Journal of Cereal Science*, 1992, 16(2): 141-152.
- [21] AIZONO Y, FUNATSU M, SUGANO M, et al. Enzymatic properties of rice bran lipase [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1973, 37(9): 2031-2036.
- [22] RAJESHWARA A N, PRAKASH V. Purification and characterization of lipase from rice (*Oryza sativa* L.) bran [J]. *Food/Nahrung*, 1995, 39(5-6): 406-418.
- [23] 徐扬. 脂肪酶SMG1制备高纯度甘油二酯的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [24] ÇOLAK A, ŞIŞIK D, SAGLAM N, et al. Characterization of a thermoalkalophilic esterase from a novel thermophilic bacterium, *Anoxybacillus gonensis* G2 [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(5): 625-631.
- [25] 柳萌,刘瑞玲,郜海燕,等. 蓝莓采后病原菌胞外脂肪酶的提取及粗酶性质研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 62-69.
- [26] 张萌,张晓梅,窦文芳,等. 嗜盐脂肪酶产生菌的筛选及其粗酶性质[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 14-19.
- [27] 舒正玉,杨江科,闫云君. 黑曲霉F044脂肪酶的分离纯化及酶学性质研究[J]. 生物工程学报, 2007, 1: 96-100.
- [28] SUGIHARA A, SHIMADA Y, TOMINAGA Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1988, 52(6): 1591-1592.
- [29] CUNHA R L O R, FERREIRA E A, OLIVEIRA C S, et al. Biocatalysis for desymmetrization and resolution of stereocenters beyond the reactive center: how far is far enough? [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(5): 614-623.
- [30] UNGCHAROENWIWAT P, ARAN H. Purification and characterization of lipase from *Burkholderia* sp. Eq3 isolated from wastewater from a canned fish factory and its application for the synthesis of wax esters [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2015, 115: 96-104.
- [31] WANG S L, LIN Y T, LIANG T W, et al. Purification and characterization of extracellular lipases from *Pseudomonas monteilii* Tku009 by the use of soybeans as the substrate [J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2009, 36(1): 65-73.