

张莹莹,李志,张璐璐,等. 柠檬烯转化酶的提取条件优化及酶学性质研究[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 105-113.

DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.015

柠檬烯转化酶的提取条件优化及酶学性质研究

张莹莹,李志,张璐璐,李晓,范刚,彭芷芊,任婧楠,潘思轶

华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070

摘要 以指状青霉(*Penicillium digitatum*) DSM62840 为研究对象,采用高压细胞破碎法破碎菌体,对其转化柠檬烯生成 α -松油醇过程中的相关酶的提取条件进行优化。以柠檬烯转化酶活性为指标,在单因素试验的基础上结合响应面法,确定最佳提取条件;同时,对柠檬烯转化酶的酶学性质进行了初步探索。结果显示,最佳提取条件为:破碎压力 100 MPa、破碎 6 次、液料比 15:1 (mL/g),在此条件下, α -松油醇的质量浓度为 855.75 mg/L,酶活力达到 71.31 U。柠檬烯转化酶最佳转化时间为 4 h,在磷酸盐缓冲液中获得酶活性最高;该酶可能为细胞色素 P450,且不同的金属离子对酶活性的影响不同:Fe²⁺ 对酶有轻微的抑制作用,而 Ca²⁺、Mg²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Ba²⁺、Na⁺、K⁺、Fe³⁺、Ni²⁺ 则对酶有不同程度的激活作用。粗酶液 SDS-PAGE 电泳结果表明优化后的提取工艺效果较好。

关键词 指状青霉;柠檬烯;提取条件;生物转化;柠檬烯转化酶;响应面优化;酶活性

中图分类号 TS 201.2⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)04-0105-09

柠檬烯,一种单萜烯化合物,在柑橘类水果中广泛存在^[1]。柠檬烯的 C8 位氧化产物 α -松油醇^[2] 是目前香料行业中商业价值较高的单萜醇之一,其年消耗量约为 9.2 t^[3]。大量研究表明 α -松油醇具有抗氧化、抗癌、抗惊厥和镇静等方面的作用^[4]。

指状青霉(*Penicillium digitatum*) DSM62840 能够专一性地转化柠檬烯生成 α -松油醇,利用高压细胞破碎法对柠檬烯转化生成 α -松油醇过程中相关酶的提取条件进行优化,以此获得较高活性的柠檬烯转化酶。

在前期的工作中发现柠檬烯转化酶位于细胞内,必须对细胞进行破壁处理。高压法破碎细胞的原理是利用样品在通过极小的缝隙时,由于高压能量喷出,产生碰撞、剪切和空腔三大效应^[5-6],从而使细胞破碎,目前已广泛用于红色诺卡氏菌和裂殖壶菌等菌体的细胞破碎^[7]。

本研究采用高压细胞破碎辅助提取柠檬烯转化酶,考察了破碎压力、破碎次数和液料比对柠檬烯转化酶活性的影响,优化提取条件,并对柠檬烯转化酶性质进行了初步探索,为指状青霉 DSM62840 转化柠檬烯生成 α -松油醇的工业化应用和后续柠檬烯

转化酶的分离纯化提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

指状青霉(*Penicillium digitatum*) DSM62840 购自德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)。指状青霉 DSM62840 接种于 PDA 斜面上,25 °C 培养 7 d,在 4 °C 保存。将 4 °C 放置的菌株转接于新鲜的 PDA 斜面培养基上,进行活化处理,25 °C 培养 7 d,每 7 d 转接 1 次。

乙二胺四乙酸(EDTA)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、甘油,分析纯,均购于国药集团化学试剂有限公司;R-(+)-柠檬烯标准品,购于东京化工有限公司;一氧化碳(高纯度)、美替拉酮(metyrapone, 96%)、酮康唑(ketoconazole, $\geq 98\%$),购于麦克林化学试剂有限公司;丙烯酰胺、四甲基乙二胺、过硫酸铵(电泳专用级),购于北京庄盟国际生物基因科技有限公司;蛋白彩虹 marker,购于上海碧云天生物技术有限公司。

MYB 培养基:酵母提取物 30 g/L、麦芽提取物 20 g/L、葡萄糖 10 g/L、蛋白胨 10 g/L。

收稿日期: 2020-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671824);国家重点研发计划专项(2017YFD0400101)

张莹莹,硕士研究生. 研究方向: 果蔬加工和风味化学. E-mail: 843405813@qq.com

通信作者: 范刚,博士,教授. 研究方向: 果蔬加工和风味化学. E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn

Avanti JXN 型冷冻离心机,美国 Beckman 公司;JN-10C 高压细胞破碎仪,广州聚能纳米生物科技股份有限公司;XHF-DY 高速分散器,宁波新芝生物科技股份有限公司;SHZ-D 循环水式多用真空泵,郑州科华仪器设备有限公司;Agilent 6890N 型气相色谱仪联合 5975B 质谱仪,美国 Agilent 公司;DYCZ-24DN 型电泳仪,北京六一生物技术有限公司。

1.2 柠檬烯转化酶的提取

用 7~14 d 的指状青霉 DSM62840 斜面培养物制取孢子悬浮液,再按 1% 的接种量接种于 MYB 培养基中,24 °C、140 r/min 振荡培养 48 h,真空抽滤得到菌体,用磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 重新悬浮,然后再抽滤去除培养基成分,重复 3 次。将洗涤好的菌体溶解于磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中,每 10 g 菌体 (湿质量) 溶解于 100 mL 的缓冲液中,经高速分散器处理 5 min,再用高压细胞破碎仪破碎 5 次 (1 L 样品破碎 1 次需 8 min),压力 150 MPa,然后 10 000 r/min、4 °C 离心 30 min,取上清液。

1.3 柠檬烯转化酶活性的测定

采用气相色谱-质谱法 (GC-MS)^[8] 测定柠檬烯转化酶活性。Agilent 6890N 型气相色谱仪,气相色谱条件为:HP-5 毛细管柱 (30 m×320 mm×0.25 μm);程序升温,40 °C 下持续 3 min,以 3 °C/min 的增加量升至 160 °C,保持 2 min,再以 8 °C/min 升至 220 °C,保持 3 min。进样口温度 250 °C,检测器温度 250 °C。

Agilent 5975B 质谱仪,质谱条件为:四极杆温度和离子源温度分别为 150 和 230 °C,采用 EI 的离子化方式,电子能量 70 eV,扫描质量范围 m/z 45~550。使用计算机谱 (NIST05/WILE7.0) 对 α -松油醇进行定性分析,外标法进行定量。

利用上述方法测定不同质量浓度的 α -松油醇对应的峰面积,绘制标准曲线,得到峰面积与 α -松油醇的质量浓度的线性方程:峰面积 = $348\ 569 \times C_{\alpha\text{-松油醇}} - 3\ 000\ 000$,相关系数 0.990 1,有较好的拟合效果,可用于 α -松油醇的定量计算。其中, $C_{\alpha\text{-松油醇}}$ 代表 α -松油醇的质量浓度,mg/L。

酶活力单位的定义:在一定的条件下,1 h 产生 1 mg/L 的 α -松油醇即为一个酶活力单位 (U)。

1.4 单因素及响应面试验设计

在 4 °C 下,采用高压细胞破碎法辅助提取柠檬烯转化酶,使用磷酸盐缓冲液进行提取。分别研究

破碎压力、破碎次数和液料比对酶活力的影响。每个单因素水平重复 3 次。在单因素试验基础上,结合 Box-Behnken 试验设计原理,采用三因素三水平响应面分析法,以酶活力为响应值,考察破碎压力 (A)、破碎次数 (B) 和液料比 (C) 对响应值的影响,对提取条件进行优化。

1.5 柠檬烯转化酶活力的研究

1) 反应时间对柠檬烯转化酶的酶活力的影响。取粗酶液 1 mL,加入 1 μL 柠檬烯,混合均匀,于 24 °C、140 r/min 分别反应 4、8、12、16、20、24 h 后,比较不同反应时间下柠檬烯转化酶的活性,探究最佳反应时间。每组试验重复 3 次,下同。

2) 缓冲液体系对柠檬烯转化酶的酶活力的影响。重复本文“1.2”中的操作步骤,仅改变缓冲液种类,分别使用磷酸盐 (PBS) 缓冲液、HEPES 缓冲液和 Tris-HCl 缓冲液对柠檬烯转化酶进行提取,取粗酶液 1 mL,分别加入 1 μL 柠檬烯后混合均匀,于 24 °C、140 r/min 反应 12 h 后,测定酶活力。

3) 添加物对柠檬烯转化酶的酶活力的影响。取粗酶液 1 mL,分别加入 1 μL 柠檬烯和 1 mmol/L 抑制剂,抑制剂分别是美替拉酮、酮康唑和 EDTA,混合均匀,于 24 °C、140 r/min 反应 12 h,测定酶活力。同时设置空白对照,试验重复 3 次。

4) 金属离子对柠檬烯转化酶活力的影响。分别向粗酶液中添加 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Fe^{3+} 、 Ni^{2+} 等金属离子溶液,金属离子浓度分别为 2 和 5 mmol/L,混合均匀,于 24 °C、140 r/min 反应 12 h,测定酶活力,设置不添加金属离子组为对照,结果用相对酶活表示 (即试验组酶活占不添加金属离子组酶活的百分比)。

1.6 柠檬烯转化酶的表面征

1) 粗酶液的 CO 活性检测。参考 Omura 等^[9] 和 Schenkman 等^[10] 的方法,并做适当修改,对柠檬烯转化酶的粗酶液进行 CO 差示光谱表征。取混合均匀后的粗酶液 0.6 mL,等量分成 2 份,加入 2 个微量比色皿中,对照组和实验组分别编号为 P1 和 P2,记录波长 400~500 nm 的基线。在 P1 和 P2 中加入等量 (1 mg) 低亚硫酸钠粉末,混合均匀;取出 P2,通入 CO 气体 (通风橱内操作) 后静置 30 s,重复记录 P1 和 P2 中样品在 400~500 nm 的紫外吸收光谱,扫描至样品在 450 nm 附近的吸光值没有变化即可停止。

2) 粗酶液的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-

PAGE)。参照闫青^[11]的方法,并做适当修改。使用本文“1.4”优化得到的高压细胞破碎条件提取柠檬烯转化酶,得到粗酶液。配制12%的分离胶溶液和4%的浓缩胶溶液,使用垂直板电泳,分别吸取蛋白Marker和样品加入点样孔内,初始电压为80V,待样品移动到分离胶时调节电压为100V,保持恒压,约2h电泳结束。取胶,用考马斯亮蓝R250过夜振荡染色,然后脱色至凝胶背景透明,利用BIO-RAD蛋白凝胶呈像处理系统采集图像。

1.7 数据处理及分析

试验数据用Excel 2016进行整理,使用SPSS19.0和Design Expert 8.0软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

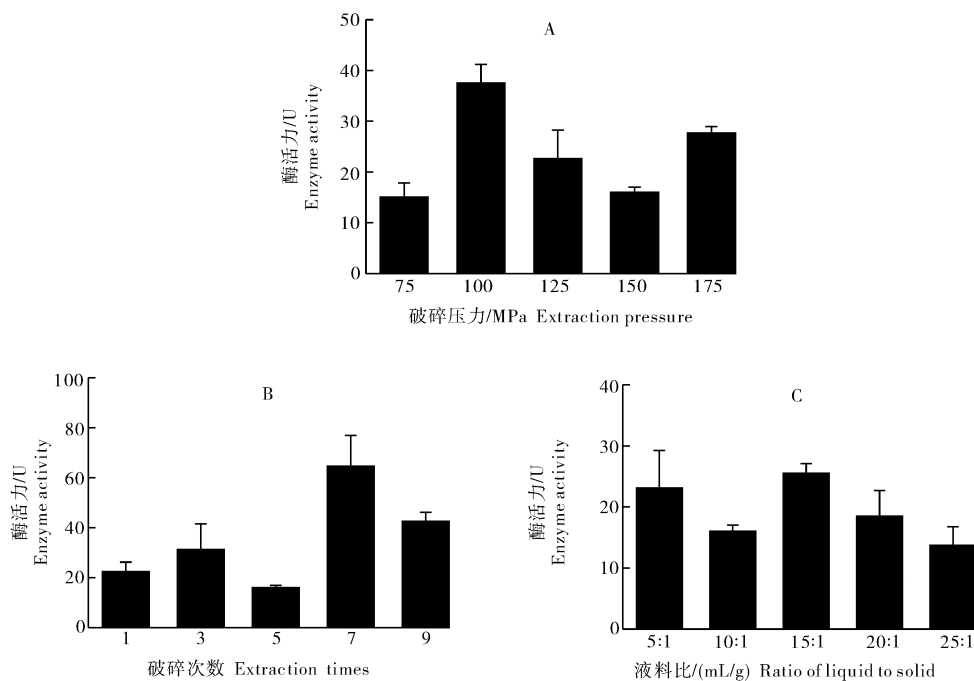
2.1 高压细胞破碎辅助提取柠檬烯转化酶的单因素试验

1) 破碎压力对柠檬烯转化酶活力的影响。在高压下细胞破碎5次,液料比为10:1(mL/g)的条件下,考察高压细胞破碎压力对酶活力的影响,结果如图1A所示。随着破碎压力的增加,酶活力显著增加,当破碎压力达到100MPa时,酶活力达到最大值;但随着破碎压力继续增大,其呈下降趋势。这有

可能是因为高压破坏了细胞膜和细胞壁,胞内的渗透压使其内含物全部释放出来。如果破碎压力过大,酶的高级结构可能会因为反应体系内部的高压遭到破坏^[12],从而降低柠檬烯转化酶活力。因此,选择破碎压力为100MPa较为适宜。

2) 破碎次数对柠檬烯转化酶活力的影响。在细胞破碎压力为150MPa,液料比为10:1(mL/g)的条件下,考察高压细胞破碎次数对酶活力的影响,结果如图1B所示。随着破碎次数的增加,酶活力呈上升趋势,当破碎7次时,酶活力达到最大值;随后增加破碎次数,酶活力反而下降。在一定范围内,柠檬烯转化酶活力随破碎次数增加而增加,这可能是因为增加破碎次数有助于酶的溶出,破碎7次时,细胞内的柠檬烯转化酶已基本溶出,此时酶活力达到最大值。继续增加破碎次数,处理时间过长,可能会导致柠檬烯转化酶结构破坏^[13],酶活力降低。因此,选择破碎7次较为合适。

3) 液料比对柠檬烯转化酶活力的影响。在高压细胞破碎压力为150MPa、破碎5次的条件下,考察液料比对酶活力的影响,结果如图1C所示。随着液料比的增大,酶活力有所增加,增加至15:1(mL/g)时,酶活力达到最大值;液料比继续增大,酶



A: 破碎压力; B: 破碎次数; C: 液料比。 A: Extraction pressure; B: Extraction times; C: The ratio of liquid to solid.

图1 高压细胞破碎辅助提取柠檬烯转化酶的单因素试验

Fig.1 The effects of high pressure cracker on enzyme activity by single factor experiment

活力下降。当液料比为 5 : 1 (mL/g) 时, 酶活力也较高, 但浓度过低, 一次收集到的菌体碎片少, 能耗较大, 不适于产业化生产。综合考虑, 选择液料比为 15 : 1 (mL/g) 较为合适。

2.2 高压破碎法辅助提取柠檬烯转化酶的响应面试验

1) 响应面试验设计及结果。在单因素试验基础上, 结合 Box-Behnken 试验设计原理, 采用三因素三水平响应面分析法, 以酶活力为响应值, 考察破碎压力(A)、破碎次数(B)和液料比(C)对响应值的影响, 优化提取条件。响应面试验的因素水平编码值和试验方案结果分别见表 1 和表 2。

表 1 响应面试验的因素和水平编码值

Table 1 Coded factors and levels in quadratic regression rotational combinational design

水平 Levels	因素 Factors		
	A 破碎压力/MPa Extraction pressure	B 破碎次数 Extraction times	C 液料比/(mL/g) Ratio of liquid to solid
-1	75	5	10 : 1
0	100	7	15 : 1
1	125	9	20 : 1

表 2 响应面分析试验设计方案及结果

Table 2 The corresponding results for response surface experiment

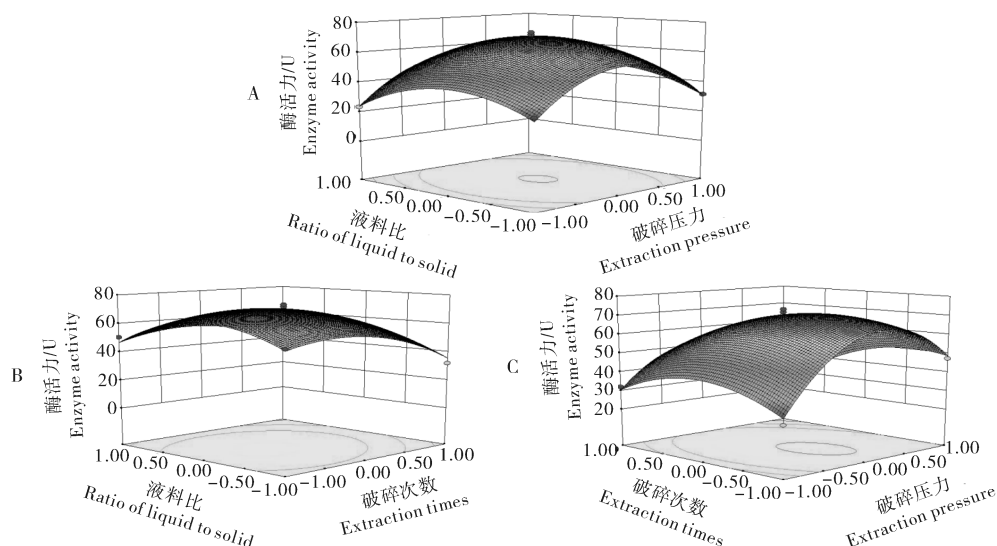
序号 Number	A	B	C	酶活力/U Enzyme activity
1	0	1	-1	31.94
2	0	0	0	68.72
3	1	0	-1	31.60
4	0	0	0	71.59
5	0	0	0	69.03
6	-1	-1	0	26.20
7	-1	0	1	23.38
8	0	1	1	36.02
9	0	0	0	69.88
10	0	-1	1	50.40
11	1	-1	0	47.18
12	0	0	0	73.10
13	1	0	1	29.57
14	-1	0	-1	30.72
15	0	-1	-1	53.54
16	-1	1	0	31.95
17	1	1	0	24.31

2) 因素与得率模型的建立及显著性检验。应用 Design Expert 8.0 软件对表 3 中的数据进行分析, 得到破碎压力(A)、破碎次数(B)、液料比(C)与酶活力的回归方程如下: $Y = 70.46 + 2.55A - 6.64B - 1.05C - 7.16AB + 1.33AC + 1.8BC - 26.11A^2 - 11.95B^2 - 15.54C^2$ 。显著性检验结果见表 3。表 3 的方差分析结果中, 构建模型 P 值 $< 0.000 1$, 极显著, 具有统计学意义。失拟 $P = 0.056 3 > 0.05$, 不显著, 说明失拟因素不存在。结合回归方程分析, R^2 为 0.986 5, 这说明该模型与实际情况拟合度较好。不同因素之间存在交互作用, B 的 P 值小于 0.01, 说明破碎次数对柠檬烯酶活性影响极显著, A 和 C 没有显著性; A^2 、 B^2 、 C^2 对柠檬烯酶活性的影响均达到了极显著 ($P < 0.01$) 水平。在一定范围内, F 值的大小可以反映出各因素对柠檬烯酶活性的影响作用强弱, 强弱关系依次为: 破碎次数(B) $>$ 破碎压力(A) $>$ 液料比(C)。

3) 响应面图分析及最佳工艺验证结果。破碎压力、破碎次数和液料比之间的交互作用对酶活力的影响结果见图 2。由表 3 和图 2 可知, AB 的 P 值小于 0.01, 破碎压力与破碎次数交互作用显著, 其余各因素之间交互作用都很小。根据模型得到的最佳提取工艺条件为破碎压力 102.2 MPa, 破碎次数为 6.38 次, 液料比为 14.75 : 1 (mL/g)。在此条件下, 柠檬烯酶活性为 71.63 U。参考实际操作, 将优化后的工艺参数调整为破碎压力 100 MPa、破碎 6 次、液料比 15 : 1 (mL/g), 在此条件下进行 3 次重复试验验证, 得到柠檬烯转化酶的平均酶活力为 71.31 U, 与预测值十分接近, 说明回归模型能较好地预测高压破碎辅助提取柠檬烯转化酶的提取条件, 最优试验因素参数组合有较强的可行性。

2.3 柠檬烯转化酶的性质

1) 反应时间对柠檬烯转化酶活力的影响。由图 3 可知, 柠檬烯转化酶活力随着反应时间的增加逐渐降低, 在 4 h 时酶活力最大, 约为 8 h 时酶活力的 2 倍, 反应时间为 12、16、20 和 24 h 时, 柠檬烯转化酶活力缓慢下降。这可能是由于随着反应时间的延长, 底物柠檬烯已经反应完全, 再延长反应时间, 产物 α -松油醇的浓度也不会增加, 因此, 在 12、16、20 和 24 h 时柠檬烯转化酶活力没有出现大幅度的降低。经显著性分析得到, 反应 8、12、16、20 和 24 h



A: 破碎压力和液料比对酶活力的影响; B: 破碎次数和液料比对酶活力的影响; C: 破碎压力和破碎次数对酶活力的影响。A: Response surface of the effects of extraction power and material-to-liquid ratio on enzyme activity; B: Response surface of the effects of extraction times and liquid to solid ratio on enzyme activity; C: Response surface of the effects of extraction power and extraction times on enzyme activity.

图 2 交互作用分析

Fig.2 Transactional analysis

表 3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression equation

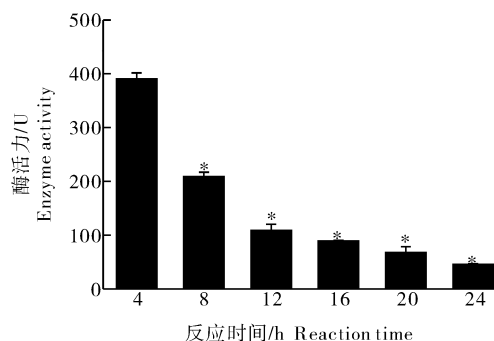
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Sources of variance	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
模型 Model	5 577.26	9	619.67	56.81	<0.000 1**
A	52.07	1	52.02	4.77	0.065 3
B	352.45	1	352.66	32.33	0.000 7**
C	8.89	1	8.89	0.82	0.396 5
AB	204.90	1	204.90	18.78	0.003 4**
AC	7.03	1	7.03	0.64	0.448 4
BC	13.01	1	13.01	1.19	0.311 0
A ²	2 869.15	1	2 869.15	263.05	< 0.000 1**
B ²	601.22	1	601.22	55.12	0.000 1**
C ²	1 016.66	1	1 016.66	93.21	<0.000 1**
剩余项 Residual	76.35	7	10.91		
失拟 Lack of fit	62.70	3	20.90	6.12	0.056 3
误差 Error	13.65	4	3.41		
总和 Total	5 653.35	16			
$R^2=0.986 5$					

注: *. 差异显著, $P < 0.05$; *. *. 差异极显著, $P < 0.01$ 。Note: *. significant difference ($P < 0.05$); very significant difference ($P < 0.05$).

的酶活力与 4 h 相比差异均显著,说明反应时间为 4 h 时产物 α -松油醇浓度达到最大值,最佳反应时间为 4 h,在以后的试验中可选择 4 h 进行反应。

2) 缓冲体系对柠檬烯转化酶活性的影响。由图 4 可知,缓冲体系对柠檬烯转化酶的酶活力影响较大。选择用 PBS 缓冲液提取柠檬烯转化酶时,酶活

力达到最大值,约为其他 2 种缓冲液的 2 倍,而 HEPES 和 Tris-HCl 缓冲液则对柠檬烯转化酶活力没有显著影响,推测可能是由于不同缓冲液中所含有的离子对于柠檬烯转化酶活性的促进及抑制作用各有不同^[14]。结果表明,使用磷酸盐缓冲液提取该酶的效果较好。



* 代表与反应时间为 4 h 时的酶活力相比差异显著 ($P < 0.05$)。
* represents the significant difference ($P < 0.05$) compared with the sample at reaction time of 4 h.

图 3 反应时间对柠檬烯转化酶活性的影响

Fig.3 Effect of reaction time on limonene converting-enzyme activity

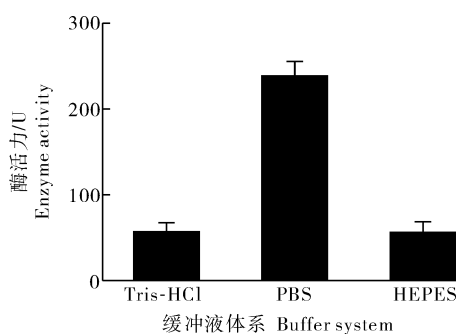


图 4 缓冲液体系对柠檬烯转化酶活性的影响

Fig.4 Effect of buffer on limonene converting-enzyme activity

3) 添加物对柠檬烯转化酶的影响。分别添加 3 种浓度均为 1 mmol/L 的抑制剂,测定柠檬烯转化酶的相对酶活,结果见表 4。细胞色素 P450 酶抑制剂美替拉酮和酮康唑能够抑制柠檬烯转化酶活性,说明在 *P. digitatum* DSM62840 生物转化柠檬烯生成 α -松油醇的过程中,细胞色素 P450 酶发挥了作用^[15-16]。添加金属离子螯合剂 EDTA 后,显著抑制了柠檬烯的微生物转化,仅为空白组酶活的 60%,说明在柠檬烯转化的过程中除了涉及到细胞色素 P450 外,还可能涉及到其他酶,并且这个酶含有其他的金属离子活性位点。

4) 金属离子对柠檬烯转化酶的影响。在之前的试验中,发现金属离子螯合剂 EDTA 能够明显地抑制柠檬烯生物转化,降低酶活力,这可能是由于 EDTA 与酶的金属离子活性位点结合。所以进一步研究了金属离子对酶活性的影响。由表 5 可知,当添加 2 mmol/L 的金属离子时,只有 Fe^{2+} 对酶活性有

轻微的抑制作用,其余离子则对酶有不同程度的激活作用;其中, Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 对酶活的激活作用较大,并且与不添加金属离子的空白组相比, Fe^{3+} 能够显著增加酶活力。当添加 5 mmol/L 的金属离子时, Ni^{2+} 对酶活性有轻微抑制作用, Fe^{2+} 能够显著地抑制酶的活性,其余的金属离子对酶有不同程度的激活作用,这与 2 mmol/L 浓度时对酶活的影响相同。

表 4 添加物对柠檬烯生物转化的影响

Table 4 The effects of additives on limonene biotransformation

添加物 Additive	相对酶活/% Relative enzyme activity
空白 None	100
美替拉酮 Metyrapone	68.10 ± 6.16
酮康唑 Ketoconazole	64.08 ± 6.79
EDTA	60.54 ± 4.67 *

注: * 代表与空白相比差异显著 ($P < 0.05$)。Note: * represents a significant difference from none ($P < 0.05$).

表 5 金属离子对柠檬烯生物转化的影响

Table 5 The effects of metal ions on limonene biotransformation

金属离子 Metal ion	相对酶活/% Relative enzyme activity	
	2 mmol/L	5 mmol/L
空白 None	100	100
Fe^{2+}	91.01 ± 6.24	75.41 ± 9.47 *
Fe^{3+}	164.54 ± 21.85 *	118.97 ± 59.11
Ba^{2+}	112.27 ± 23.09	129.29 ± 0.03
Zn^{2+}	152.09 ± 51.17	145.88 ± 58.68
K^{+}	124.6 ± 10.78	103.24 ± 33.36
Mg^{2+}	119.26 ± 15.93	134.35 ± 12.85
Na^{+}	115.61 ± 13.82	120.39 ± 19.20
Mn^{2+}	168.31 ± 57.64	161.88 ± 19.66
Co^{2+}	163.83 ± 33.65	186.81 ± 46.18
Ni^{2+}	139.29 ± 18.07	93.96 ± 16.16
Ca^{2+}	118.2 ± 23.75	191.14 ± 52.04

注: * 代表与空白相比差异显著 ($P < 0.05$)。Note: * represents a significant difference from none ($P < 0.05$).

2.4 CO 差示光谱

为进一步验证 P450 酶的存在,本试验利用粗酶液进行 CO 活性检测。根据 P450 酶的蛋白生化特征^[17],又结合图 5 所示的 CO 差示光谱中位于 450 nm 处的一个特征吸收峰(箭头所指),初步说明在该粗酶液中存在一个具有可溶性且能与 CO 结合的亚铁血红素蛋白。与 CO 结合后在 450 nm 处产生的吸收峰值较小,这可能是粗酶液中的该蛋白质的溶解度较低造成的。另一个较为明显的现象就是 CO 差示光谱在 420 nm 处出现了明显的吸收峰,推测可能是由于 P450 失活后转变为 P420, P420 又与 CO 结合引起的^[18],并且在 420 nm 处的吸收峰

较高。研究发现真菌中的 P450 分离到细胞外后较易失活^[19],这说明有相当数量的 P450 在分离过程中失去了活性,转化为 P420。

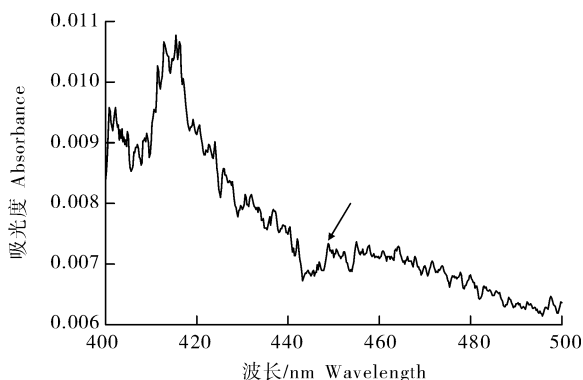
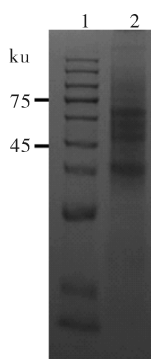


图5 CO 差示光谱

Fig.5 CO difference spectra

2.5 粗酶液 SDS-PAGE 电泳分析

在破碎压力 100 MPa、破碎 6 次、液料比 15 : 1 (mL/g) 的条件下提取柠檬烯转化酶,获得的粗酶液通过 SDS-PAGE 电泳结果如图 6 所示。大多数的真菌细胞色素 P450 的分子质量位于 40~60 ku^[17] 内,由图 6 可以看到,有几条较粗的蛋白质条带集中在分子质量 45~65 ku,说明这一部分的蛋白可能就是菌株能够转化柠檬烯生成 α -松油醇的目标蛋白,证明经过条件优化后能达到较好的提取效果。



1:Marker;2:样品 Sample.

图6 粗酶液 SDS-PAGE 电泳图

Fig.6 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of crude enzyme

3 讨论

目前,虽然关于柠檬烯生物转化生成 α -松油醇的研究较多,但尚未发现把提取方法作为侧重点对柠檬烯转化酶进行研究的报道,多是对柠檬烯转化

过程中参数如底物浓度、转化温度和时间的优化^[3,20]。在前期试验中我们发现该酶位于细胞内,本试验选用高压细胞破碎法进行提取,结果得到在最优破碎条件下 α -松油醇的质量浓度为 855.75 mg/L,酶活力达到 71.31 U,与台亚楠^[20]优化后得到的 α -松油醇质量浓度 833.93 mg/L 相比,高出 2.62%。万红贵等^[21]比较了不同破壁方法对三孢布拉霉提取番茄红素的影响,发现利用高压均质法提取能获得较高的番茄红素提取量,与其他方法相比,高压均质法具有处理量大、破碎效果好等优点,适合于工业化生产。在进行柠檬烯转化酶相关研究前对提取工艺进行优化,及时选择酶活性较高的酶进行分离纯化的试验,这对于柠檬烯转化酶的后续研究以及酶的工业化应用具有重要意义。

在研究破碎压力对柠檬烯转化酶活性的影响时发现,酶活力随着破碎压力的增加先增加后降低,而压力为 175 MPa 时的酶活力却比 150 MPa 更高,这与王雪等^[12]研究抽提物 G-6-PDH 活性随压力的变化趋势不同。压力为 175 MPa 时,高温高压会对酶活造成一定损失,但由于 175 MPa 相对压力增加,作用于菌体细胞的作用力增强,细胞壁被破坏数量增加,使菌体释放的酶量增加^[22]。因此,该现象的出现可能是由于更多菌体细胞壁被破坏而造成酶活力增加的程度超过了因高温高压造成的酶活损失程度。

研究发现,胞内酶提取效果的好坏与所用的匀浆缓冲液类别有一定关系^[17]。本试验发现提取时使用磷酸盐缓冲液获得的酶活性较高,说明磷酸盐缓冲液可以较好地保护酶活性。反应时间对柠檬烯的转化也有一定影响,本试验发现柠檬烯转化酶活性随着反应时间的延长逐渐降低,Agrawal 等^[23]在利用黑曲霉转化 α -萜品烯生成马鞭草酮的研究中发现,由于长时间转化,马鞭草酮进一步转化为其他降解产物,导致产品产量下降。因此,推测柠檬烯转化生成 α -松油醇的过程中,长时间转化产量下降,相应酶活力降低,这可能与 α -松油醇转化为其他物质有关。台亚楠^[20]在研究转化时间对指状青霉 DSM62840 转化柠檬烯过程中 α -松油醇产量的影响时得出,产物 α -松油醇在最初的 12 h 大量生成,此后在 24 和 48 h 产量逐渐下降,与本试验结果不同。

本试验利用添加物、金属离子和 CO 差示光谱对柠檬烯转化酶性质进行了初步探索,在研究添加物的影响时发现,细胞色素 P450 酶抑制剂美替拉

酮^[15]对柠檬烯的生物转化,抑制率为 31.9%,表明 *P. digitatum* DSM62840 转化柠檬烯生成 α -松油醇的酶可能是一种细胞色素 P450。真菌细胞色素 P450 多为膜蛋白^[17],溶解度低,宁大亮等^[18]利用光谱法检测白腐真菌细胞色素 P450 进行了研究,发现通气和还原条件对 P450 检测值有显著影响,因此,关于细胞色素 P450 在提取液里的存在仍有待进一步研究。Poonsin 等^[24]发现 EDTA 能够抑制胰蛋白酶活性,认为是由于 EDTA 螯合了维持胰蛋白酶活性所需的 Ca^{2+} 而导致的酶活力降低。本试验中 EDTA 也显著抑制了生物转化,因此,推测可能是由于 EDTA 螯合了柠檬烯转化酶保持活性所需的金属离子,影响了酶的结构,导致部分活性的丧失。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 和 Mn^{2+} 对酶有不同程度的激活作用,说明这些金属离子对柠檬烯生物转化有一定的促进作用,后续可以选择促进作用较大的离子进一步研究。

参考文献 References

- [1] 曹甜,刘晓艳,丁心,等.柠檬烯的研究与应用进展[J].农产品加工,2017(16):51-54. CAO T, LIU X Y, DING X, et al. Advances in research and application of limonene[J]. Farm products processing, 2017(16):51-54 (in Chinese with English abstract).
- [2] TAI Y N, XU M, REN J N, et al. Optimization of α -terpineol production by limonene biotransformation using *Penicillium digitatum* DSM 62840[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2016, 96(3):954-961.
- [3] MOLINA G, PESSOA M G, BICAS J L, et al. Optimization of limonene biotransformation for the production of bulk amounts of α -terpineol [J/OL]. Bioresource technology, 2019, 294: 122180 [2020-02-22]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122180>.
- [4] KHALELL C, TABANCA N, BUCHBAUER G. α -Terpineol, a natural monoterpene; a review of its biological properties[J]. Open chemistry, 2018, 16(1):349-361.
- [5] YAP B H J, DUMSDAY G J, SCALES P J, et al. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation [J]. Bioresource technology, 2015, 184:280-285.
- [6] OLMSTEAD I L D, KENTISH S E, SCALES P J, et al. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass[J]. Bioresource technology, 2013, 148:615-619.
- [7] 何伟,潘梅萍,林锦彬,等.红色诺卡氏菌高压均质破壁的研究[J].临床医药文献杂志,2014,5(1):724-725. HE W, PAN M P, LIN J B, et al. Research of red *Nocardia* high-pressure homogenization broken[J]. Journal of clinical medical literature, 2014, 5(1):724-725 (in Chinese with English abstract).
- [8] 樊二齐,王云华,郭叶,等.6种木兰科植物叶片精油的气质联用(GC-MS)分析[J].浙江农林大学学报,2012,29(2):307-312. FAN E Q, WANG Y H, GUO Y, et al. Chemical components of essential oils from leaves of six Magnoliaceae species using GC-MS[J]. Journal of Zhejiang A & F University, 2012, 29(2):307-312 (in Chinese with English abstract).
- [9] OMURA T, SATO R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes[J]. Journal of biological chemistry, 1964, 239(7):2370-2378.
- [10] SCHENKMAN J B, JANSSON I. Spectral analyses of cytochrome P450[J]. Methods in molecular biology, 1998, 107:25-33.
- [11] 闫青.黑曲霉耐热 β -葡萄糖苷酶的分离纯化及结构分析[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2016. YAN Q. Isolation, purification and structure characterization of thermal resistant β -glucosidase of *Aspergillus niger*[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science and Technology, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [12] 王雪,权春善,王建华,等.不同细胞破碎方法对无细胞蛋白表达系统细胞抽提物活性的影响[J].中国生物工程杂志,2011,31(1):46-50. WANG X, QUAN C S, WANG J H, et al. The influence of different cell disruption methods on the activity of the extract in cell-free protein synthesis system[J]. China biotechnology, 2011, 31(1):46-50 (in Chinese with English abstract).
- [13] 付尽国,班甲,李浩洋,等.酶法辅助超高压均质技术提取裂殖壶菌油脂[J].食品科技,2017,42(4):16-20. FU J G, BAN J, LI H Y, et al. Lipid extraction from *Schizochytrium* sp. by enzyme assisted with ultra-high pressure homogenization[J]. Food science and technology, 2017, 42(4):16-20 (in Chinese with English abstract).
- [14] 谢燕纯,陈彦梅,张扬,等.海洋细菌 ZQM2017 产琼胶酶活性测定条件优化[J].广州化工,2018,42(24):85-88. XIE Y C, CHEN Y M, ZHANG Y, et al. Optimization of conditions for determination of agar producing enzyme activity by DNS method for agrase from *Vibrio* sp. ZQM2017[J]. Guangzhou chemical industry, 2018, 42(24):85-88 (in Chinese with English abstract).
- [15] LEERBERG M N N, ALME T N, HANSEN T W R. Metyrapone, an inhibitor of cytochrome oxidases, does not affect viability in a neuroblastoma cell model of bilirubin toxicity[J]. Molecular genetics and metabolism reports, 2014(1):197-202.
- [16] 叶丽.雄甾-4-烯-3,17-二酮的 11α 羟化及人参皂苷 Rd 微生物转化研究[D].上海:复旦大学,2010. YE L. Microbial 11α -hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione and microbial transformation for ginsenoside Rd production[D]. Shanghai: Fudan University, 2010 (in Chinese with English abstract).
- [17] 曲映红.细胞色素 P450 的提取及检测研究进展[J].山东化工,2016,45(11):53-54. QU Y H. Research progress on extraction and detection of cytochrome P450[J]. Shandong chemical in-

- dustry, 2016, 45 (11): 53-54 (in Chinese with English abstract).
- [18] 宁大亮,王慧,李冬.白腐真菌细胞色素 P450 的诱导及检测方法研究[J].环境科学,2009,30(8):2485-2490. NING D L, WANG H, LI D. Induction and measurement of cytochrome P450 in white rot fungi[J]. Environmental science, 2009, 30 (8):2485-2490(in Chinese with English abstract).
- [19] 郑明奇,张文吉,邱星辉,等.四种去垢剂对棉铃虫微粒体细胞色素 P450 的增溶与变性作用[J].昆虫学报,2004,47(6):744-748. ZHENG M Q, ZHANG W J, QIU X H, et al. Effects of four detergents on solubilization and denaturation of microsomal cytochrome P450s in *Helicoverpa armigera* [J]. Acta entomologica sinica, 2004, 47 (6): 744-748 (in Chinese with English abstract).
- [20] 台亚楠.指状青霉 DSM-62840 转化柠檬烯为 α -松油醇的微生物转化研究[D].武汉:华中农业大学,2015. TAI Y N. The study of limonene biotransformation into α -terpineol using *Penicillium digitatum* DSM62840 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2015(in Chinese with English abstract).
- [21] 万红贵,徐传学.不同破壁工艺对三孢布拉霉提取番茄红素的影响[J].食品工业科技,2009,30(7):209-211. WAN H G, XU C X. Effect of different methods of broking the cell wall on extracting of lycopene from *Blakeslea trispora* [J]. Science and technology of food industry, 2009, 30 (7): 209-211 (in Chinese with English abstract).
- [22] 章莹颖,邓春芳,崔岩,等.不同方法对微藻细胞破碎及油脂提取效果的影响[J].中国油脂,2017,41(3):61-65. ZHANG Y Y, DENG C F, CUI Y, et al. Effect of different methods on cell disruption and oil extraction of microalgae [J]. China oils and fats, 2017, 41(3):61-65(in Chinese with English abstract).
- [23] AGRAWAL R, JOSEPH R. Bioconversion of α -pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 53: 335-337.
- [24] POONSIN T, SIMPSON B K, BENJAKUL S, et al. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle [J]. International journal of biological macromolecules, 2019, 133: 971-979.

Optimization of extraction conditions of limonene converting-enzyme and study on enzymatic properties

ZHANG Yingying, LI Zhi, ZHANG Lulu, LI Xiao, FAN Gang, PENG Zhiqian, REN Jingnan, PAN Siyi

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University/
Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

Abstract With *Penicillium digitatum* DSM62840 as the object of research, the extraction conditions of related enzymes in the process of converting limonene to α -terpenol were optimized to obtain high activity. And limonene converting-enzyme was extracted by high pressure cell crushing method. Taking the limonene converting-enzyme activity as evaluation indicator, the response surface methodology was used to optimize the extraction technology based on single factor test. At the same time, the properties of limonene converting-enzyme were preliminarily studied. The results showed that the optimum conditions for extracting were as follows: disruption pressure of 100 MPa, crushing times of 6, and liquid-to material ratio of 15 : 1 (mL/g). Under the conditions, the yield of α -terpenol was 855.75 mg/L, and the enzyme activity was 71.31 U. The optimum conversion time of limonene converting-enzyme was 4 h, and the highest enzyme activity was obtained in phosphate buffer. Limonene converting-enzyme might be cytochrome P450, and different metal ions have different effects on the enzyme: Fe^{2+} had slight inhibition on the enzyme, while Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ba^{2+} , Na^+ , K^+ , Fe^{3+} and Ni^{2+} had different activation effects on the enzyme. SDS-PAGE analysis of the crude enzyme solution showed that the extraction effect could be better under the optimum conditions.

Keywords *Penicillium digitatum*; limonene; extraction conditions; biotransformation; limonene converting-enzyme; response surface optimization; enzyme activity

(责任编辑:赵琳琳)