

重组脂肪氧合酶基因工程菌破碎条件优化及其酶活力测定方法研究

郭芳芳, 应琦, 张充, 陆兆新, 别小妹, 赵海珍, 吕凤霞*
(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 建立适用于从重组*E.coli*中提取重组脂肪氧合酶非机械法的破碎条件。采用化学渗透法、冻融法和酶解法破碎重组*E.coli*细胞, 并采用单因素试验和 $L_{25}(5^6)$ 正交试验对细胞破碎条件进行优化。结果表明: 溶菌酶添加量为1.5mg/mL、溶菌酶处理时间40min、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)添加量为2.0mmol/L、吐温-60添加量为2%、冻融温度(-70℃冷冻37℃融解)、冻融次数3次, 效果最佳, 获得粗酶液的脂肪氧合酶(LOX)酶活力为6840U/mL, 比优化前(4750U/mL)提高了0.44倍; 并在此条件下, 比较分光光度法、碘化钾-淀粉法和二甲苯酚橙法测定LOX酶活力, 其中碘化钾-淀粉法简单、灵敏、快速, 且测定体系具备肉眼可辨的特征颜色, 可用于LOX酶活性高通量筛选。

关键词: 脂肪氧合酶; 化学渗透法; 冻融法; 酶解法; 酶活力测定法

Optimization of Conditions for Disruption of Recombinant *E. coli* Cells and Determination of Lipoygenase Activity

GUO Fang-fang, YING Qi, ZHANG Chong, LU Zhao-xin, BIE Xiao-mei, ZHAO Hai-zhen, LÜ Feng-xia*
(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Recombinant *E. coli* cells were disrupted by combined non-mechanical methods, such as chemical permeation, repeated freeze-thaw and enzymatic lysis for the extraction of recombinant lipoygenase (LOX). Based on one-factor-at-a-time experiments, an $L_{25}(5^6)$ orthogonal array design was employed to optimize five process parameters. The best results for bacterial cell disruption were achieved through enzymatic lysis with 1.5 mg/mL of lysozyme for 40 min in the presence of 2.0 mmol/L EDTA-2Na and 2% Tween-60 followed by 3 repeated freeze-thaw cycles, yielding an LOX activity of 6840 U/mL in crude enzyme solution, which was 1.44-fold higher than before the optimization. Compared with spectrophotometry and xylenol orange method, potassium iodide-starch method was more simple, sensitive and rapid and the reaction system showed characteristic color visible to the naked eye. Thus, this method is suitable for high throughput screening of LOX activity.

Key words: lipoygenase; chemical permeation; freeze-thaw; enzymatic lysis; enzyme activity assay

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)23-0160-06

脂肪氧合酶(lipoygenase, LOX)广泛存在于动植物体内, 在藻类、面包酵母、真菌以及细菌中均发现它的存在。LOX能专一性催化含1,4-顺,顺-戊二烯双键体系的多不饱和脂肪酸氧化形成具有共轭双键的氢过氧化物, 这些氢过氧化物性质活泼, 是重要的化学反应中间体^[1]。LOX在食品工业中有广泛的应用, 如面粉及其制品品质改良、生成风味化合物、茶叶加工等^[2-7]。尽管人们早已认识到LOX在食品加工中的潜在应用价值, 且LOX在自然界中广泛存在, 但从自然界中直接获得不仅得率低而且纯化难, 获得LOX纯酶的成本很高。因此, 通过

基因工程菌高效表达, 且又经过简单的纯化过程获得高纯度的LOX可以解决上述问题。本实验室已克隆鱼腥藻脂肪氧合酶基因, 并实现了在大肠杆菌中的高效表达^[8], 为获得该酶, 需对重组*E.coli*细胞进行破碎。

细胞破碎的方法很多, 可分为机械法和非机械法。机械法包括高压匀浆法^[9]、珠磨法^[10]、超声破碎法^[11]等; 非机械法包括酶溶法^[12-13]、化学渗透法^[14]、反复冻融法^[15]等。超声波具有成本低、操作简单, 十分适合实验室规模的细胞破碎, 但高强度的超声波会产生热效应, 空化效应时产生瞬时高温及高压会导致酶失活; 非机械法

收稿日期: 2012-09-15

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31071605); 江苏省科技支撑计划项目(BE2011390);
苏州市科技支撑计划项目(SN201105)

作者简介: 郭芳芳(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: 2011108030@njau.edu.cn

*通信作者: 吕凤霞(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为酶工程。E-mail: lufengxia@163.com

中的酶溶法和化学渗透法常用于提取胞内可溶性蛋白^[16-17]。而反复冻融法也作为非机械破碎法的一种,具有方便、对热敏性物质没有损害,不受外源性杂质污染等优势特性,因而应用广泛。目前,破碎重组*E.coli*普遍使用超声破碎法^[18-20],而关于非机械破碎方法的文献报道较少,尤其有关重组脂肪氧合酶基因工程菌破碎方法尚未见报道。因此,本实验采用酶解法、反复冻融法和化学渗透法等非机械法破碎重组LOX基因工程菌,探索从重组*E.coli*中提取重组LOX细胞破碎条件,为LOX的制备及LOX活性高通量筛选提供参考。

基于LOX活性的高通量筛选,快速、经济、准确、灵敏地测定LOX活性是至关重要的。常规的LOX酶活测定方法是检测LOX催化反应产生氢过氧化物的速度^[21],包括分光光度法、碘化钾-淀粉法、二甲苯酚橙法等,本实验是在细胞破碎的基础上,比较几种LOX活力测定方法,并对它们的优缺点和相关性作了分析,将为脂肪氧合酶活性的高效、准确测定以及工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种、培养基与试剂

Anabaena sp. PCC 7120菌株 中图科学院水生生物所; *Escherichia coli* DH5 α 克隆宿主、*Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS表达宿主 南京农业大学酶工程研究室保藏; *Escherichia coli* T-A克隆载体pMD19-T 日本TaKaRa(大连)公司; *Escherichia coli*表达载体pET-32a 德国Novagen公司。

种子培养基和发酵培养基(LB培养基): 胰蛋白胨10g、酵母提取物5g、NaCl 10g。加水溶解后,加去离子水定容到1000mL。配制固体培养基时,按每100mL培养基加入琼脂粉1.8g。使用时向其中添加经过滤除菌的氨苄青霉素(Amp),抗生素终质量浓度为100 μ g/mL。

氨苄青霉素、溶菌酶、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na) 生工生物(上海)工程有限公司; 异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG) 大连宝生物有限公司; 酵母提取物、胰蛋白胨 英国Oxoid公司; 上海亚油酸 美国Sigma公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

HT6029 超净工作台 苏州进化设备有限公司; PYX-DHS 隔水电热式恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; HYG-A 全温摇瓶柜 太仓实验设备厂; 5840R 冷冻高速离心机 德国Eppendorf公司; UV-2450 紫外分光光度计 日本岛津公司; -70 $^{\circ}$ C低温冰箱 上海星任生物科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化

将甘油管保藏的重组菌转接到LB平板上,37 $^{\circ}$ C恒温培养,待平板上长出单菌落后,将单菌落转接至50mL/250mL种子液培养基LB中,37 $^{\circ}$ C、180r/min振荡培养14~16h至对数期备用。

1.3.2 摇瓶发酵

将培养好的种子液以3%的接种量接入100mL/250mL发酵培养基,37 $^{\circ}$ C、180r/min振荡培养至OD_{600nm}=0.6~0.8,添加IPTG使其终质量浓度为100 μ g/mL,16 $^{\circ}$ C诱导16h。

1.3.3 细胞破碎方法及酶液的提取

1.3.3.1 酶解法

用灭菌的2mL离心管取1mL菌液,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集菌体,加入100 μ L缓冲液,添加溶菌酶,设置梯度0、0.00998、0.0249、0.0495、0.146、0.238、0.370、0.454、0.883、1.429、1.875、2.20、2.50、3.70、4.54、8.33、14.29、18.75、22.22、25.00mg/mL,37 $^{\circ}$ C处理1h后,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集上清作粗酶液。

1.3.3.2 化学渗透法

EDTA-2Na法: 用灭菌的2mL离心管取1mL菌液,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集菌体,各加100 μ L缓冲液,添加EDTA-2Na,设置梯度0、0.0998、0.249、0.495、1.46、2.38、3.7、4.54、8.83、14.29、18.75、22.00、25.00mmol/L,37 $^{\circ}$ C处理后,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集上清作粗酶液。

表面活性剂法: 用灭菌的2mL离心管取1mL菌液,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集菌体,加入100 μ L缓冲液,添加表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温系列(吐温-20~吐温-80)、曲拉通(Triton X-100),使其体积分数为0、0.2%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%,37 $^{\circ}$ C处理后,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集上清作粗酶液。

1.3.3.3 冻融法

用灭菌的2mL离心管取1mL菌液,9000r/min,4 $^{\circ}$ C离心15min收集菌体,加入100 μ L缓冲液,于-70 $^{\circ}$ C和-20 $^{\circ}$ C冷冻,4、10、25、37 $^{\circ}$ C融解,反复冻融3次,9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集上清作粗酶液。

1.3.4 正交试验优化细胞破碎条件

在以上单因素试验的基础上,对影响细胞破碎的溶菌酶添加量、溶菌酶处理时间、EDTA-2Na添加量、吐温-60添加量、冻融温度及冻融次数进行正交试验,用灭菌的2mL离心管取1mL菌液,4 $^{\circ}$ C、9000r/min离心15min收集菌体,加入100 μ L缓冲液,按正交试验表添加不同量的溶菌酶、EDTA-2Na和吐温-60,37 $^{\circ}$ C处理后,反复冻融,最后9000r/min、4 $^{\circ}$ C离心15min收集上清作粗酶液,检测酶活力。

1.3.5 脂肪氧合酶活力测定

反应底物的制备: 取27 μ L亚油酸、25 μ L吐温-20和

8mL蒸馏水,加入0.5mol/L NaOH 1.1mL,定容于50mL容量瓶中,4℃保存备用。

采用分光光度法^[22]、碘化钾-淀粉法^[23]和二甲苯酚橙法^[24-25]测定脂肪氧合酶活力,酶活测定参照张充等^[8]的方法。取pH6.0的磷酸缓冲液2.78mL、酶液20μL、亚油酸钠200μL混合均匀后放入35℃水浴中并开始计时,反应3min测定反应液的吸光度。反应体系每分钟吸光度增加0.001定义为1个酶活力单位(U/mL)^[26]。

2 结果与分析

2.1 细胞破碎条件单因素试验

2.1.1 溶菌酶添加量的确定

溶菌酶是一种能水解微生物细胞壁黏多糖的碱性酶,主要通过破坏细胞壁中的N-乙酰胞壁酸和N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4-糖苷键,破坏肽聚糖支架,在内部渗透压的作用下使细胞膜破裂而导致细菌溶解死亡^[27]。由图1可知,溶菌酶在低添加量时对细胞破碎的效果不明显,当添加量达到1.429mg/mL时有明显的破碎效果,酶活力为2972U/mL,溶菌酶添加量大于2.2mg/mL时酶活力变化不大。据报道^[28]溶菌酶在pH6.0左右活性最强,因此可调整缓冲液的pH值让溶菌酶发挥最大效应。为减少成本初步将破壁溶菌酶添加量定在2.0mg/mL。

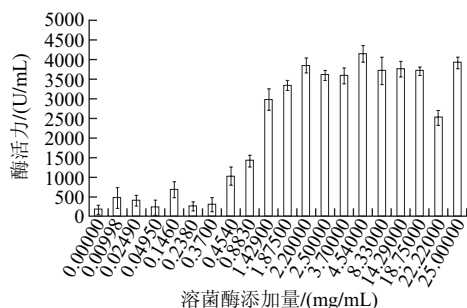


图1 溶菌酶添加量对脂肪氧合酶活性的影响
Fig.1 Effect of lysozyme dosage on cell disruption

2.1.2 溶菌酶处理时间的确定

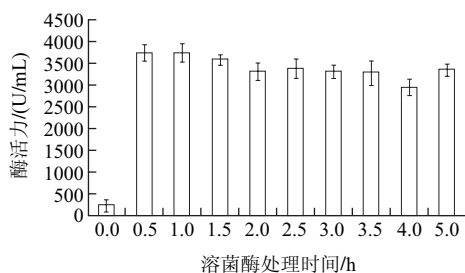


图2 溶菌酶处理时间对脂肪氧合酶活性的影响
Fig.2 Effect of lysozyme treatment time on cell disruption

选取了处理时间0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、5h,37℃处理后检测酶活,结果如图2所示。可知,

溶菌酶37℃处理0.5h,获得粗酶液的脂肪氧合酶活力为3740.8U/mL,在后续处理的几个小时里,酶活力变化不大,说明再延长处理时间对酶活力没有影响,为提高实验效率实验将会再细化处理时间,旨在用最短的时间获得最佳破碎效果。

2.1.3 EDTA-2Na添加量的确定

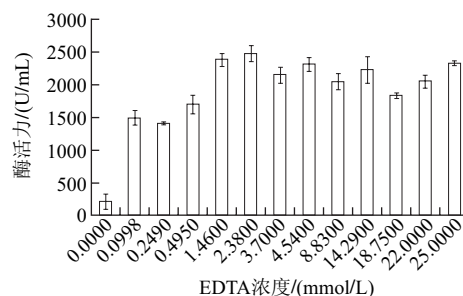


图3 EDTA-2Na添加量对脂肪氧合酶活性的影响
Fig.3 Effect of EDTA-2Na concentration on cell disruption

EDTA作为金属螯合剂,可用于处理革兰氏阴性菌(如*E.coli*),对细胞的外层膜有破坏作用^[29]。由图3可知,EDTA细胞破壁效果不明显,酶活力均在2500U/mL以下,但高浓度效果明显比低浓度好,且在2.38mmol/L时酶活最大,粗酶活力为2476.05U/mL。有报道称EDTA溶液可增强溶菌酶的抗菌活性^[30-31],但机制尚不清楚,可能是EDTA作为金属螯合剂,与细胞生长所需的一些重要金属离子结合,从而有利于溶菌酶溶解细胞壁;另一种是EDTA直接破坏细胞壁,使得细胞表面蛋白不完整,细胞膜被破坏,使之更易于被溶菌酶攻击。由此推测可能它与溶菌酶同时使用时有协同作用。

2.1.4 表面活性剂及其体积分数的确定

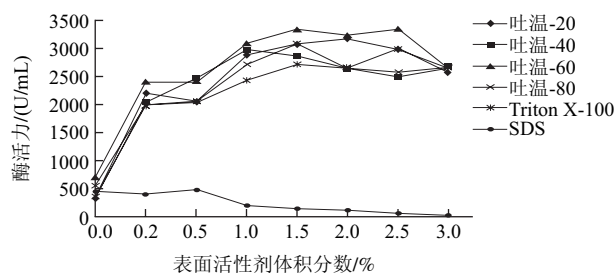


图4 表面活性剂对脂肪氧合酶活性的影响
Fig.4 Effect of surfactant (SDS) concentration on cell disruption

由图4可知,SDS处理后使得酶活急剧下降,说明SDS抑制了脂肪氧合酶的活性,且体积分数越高对酶的抑制作用越大,这与Giacominelli等^[32]报道相同。而非离子型表面活性剂吐温系列和Triton X-100处理后,酶活力随着表面活性剂体积分数的增大而增大,其中以体积分数1.5%的吐温-60破碎效果最佳,酶活达到3326.67U/mL。原因是非离子表面活性剂对疏水性物质具有很强的亲和

力,能结合并溶解磷脂,其作用部位主要是内膜的双磷脂层,如与其他试剂混合使用时破碎效果较好^[33]。

2.1.5 冻融温度的确定

表 1 冻融温度对脂肪氧合酶活性的影响

Table 1 Effect of freeze-thaw temperature on cell disruption

冻融温度(冷冻温度,融解温度)/℃	酶活力/(U/mL)
(-70, 4)	900.00±29.34
(-70, 10)	1800.32±43.45
(-70, 25)	3000.00±11.34
(-70, 37)	3550.14±26.34
(-20, 4)	466.67±44.67
(-20, 10)	1483.33±19.34
(-20, 25)	1958.33±51.23
(-20, 37)	2466.67±17.56
未处理	300.45±22.89

由表1可知,冷冻温度越低、溶解温度越高破碎效果越好,当-70℃冷冻37℃融解时,酶活力最大达3550.14U/mL。温度对细胞壁和细胞膜的破碎有极大的影响,据报道^[34],快速的低温冷冻及溶解能迅速破壁。孙利芹等^[35]研究也发现,在同一密度下,温度对细胞破碎率的影响很大,随着冻融温度的降低,细胞破碎率明显增大,-20℃时破碎率在50%左右,-30℃时破碎率就达到70%左右。这是因为由于冷冻,一方面能使细胞膜的疏水键结构破裂,另一方面胞内水结晶,引起细胞膨胀而破裂^[36]。单独使用冻融法整体上酶活力不高,可能是因为冻融使细胞膜结构变得松散,但不足以使酶完全从细胞内释放出来,因此可以考虑反复冻融法与其他方法相结合破碎细胞。

2.1.6 冻融次数的确定

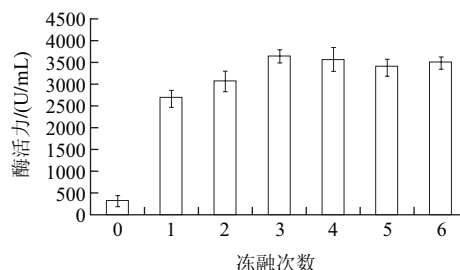


图 5 冻融次数对脂肪氧合酶活性的影响

Fig.5 Effect of repeated freeze-thaw cycles on cell disruption

反复冻融法破碎细胞主要利用细胞内冰晶的形成和细胞液浓度增高引起溶胀,每次冻融最容易生成细小冰晶体的地方是不同的,因而多次冻融能使破碎效果提高^[37]。由图5可知,冻融3次以后酶基本已释放出来,这与丁文杰等^[38]报道相符。该法操作简单方便,冻融一次只需0.5h,多次冻融能增大细胞壁的通透性,使得细胞内外产生溶液浓度差越来越大,从而将胞内蛋白水溶出来提高细胞破碎率。确定最佳的冻融次数是必要的,汤卫华等^[39]发现在相同的细胞密度下,冻融次数对细胞破碎率的影响较大,随着冻融次数的增加,细胞破碎率也随之增大。

2.2 正交试验

在单因素试验结果的基础上,以脂肪氧合酶活力作为指标,对影响细胞破碎的溶菌酶添加量、溶菌酶处理

表 2 细胞破碎条件正交试验结果

Table 2 Orthogonal array design scheme and corresponding results

试验号	A溶菌酶添加量/(mg/mL)	B溶菌酶处理时间/min	C EDTA-2Na添加量/(mmol/L)	D吐温-60添加量/%	E冻融温度(冷冻,融解)/℃	F冻融次数	酶活力/(U/mL)
1	1(1.0)	1(20)	1(0.5)	1(0.2)	1(-70, 37)	1(2)	3840.56±32.34
2	1	2(30)	2(1.0)	2(0.5)	2(-70, 25)	2(3)	3855.46±15.23
3	1	3(40)	3(1.5)	3(1.0)	3(-70, 4)	3(4)	4545.12±4.56
4	1	4(50)	4(2.0)	4(1.5)	4(-20, 37)	4(5)	5625.33±41.34
5	1	5(60)	5(2.5)	5(2.0)	5(-20, 25)	5(6)	4255.45±22.11
6	2(1.5)	1	2	3	4	5	5959.11±23.45
7	2	2	3	4	5	1	6035.21±12.34
8	2	3	4	5	1	2	6840.00±16.03
9	2	4	5	1	2	3	5235.34±18.45
10	2	5	1	2	3	4	4680.00±11.34
11	3(2.0)	1	3	5	2	4	5295.03±26.54
12	3	2	4	1	3	5	5900.34±43.23
13	3	3	5	2	4	1	3580.00±13.45
14	3	4	1	3	5	2	6065.73±9.45
15	3	5	2	4	1	3	5805.23±27.45
16	4(2.5)	1	4	2	5	3	4385.78±30.12
17	4	2	5	3	1	4	5265.36±14.56
18	4	3	1	4	2	5	4440.00±21.01
19	4	4	2	5	3	1	4880.00±22.45
20	4	5	3	1	4	3	6115.34±58.33
21	5(3.0)	1	5	4	3	2	5580.45±12.45
22	5	2	1	5	4	3	5170.00±25.87
23	5	3	2	1	5	4	3075.89±12.56
24	5	4	3	2	1	5	5995.00±30.14
25	5	5	4	3	2	1	5630.00±14.28
k ₁	4424.384	5012.186	4839.258	4833.494	5549.230	4793.154	
k ₂	5749.932	5245.274	4715.138	4499.248	4891.166	6251.362	
k ₃	5329.266	4496.202	5597.140	5493.064	5117.182	4468.328	
k ₄	5017.296	5560.280	5676.290	5497.244	5289.956	4788.322	
k ₅	5090.268	5297.204	4783.320	5288.096	4763.612	5309.980	
R	1325.548	1064.078	961.152	997.996	785.618	1783.034	

时间、EDTA-2Na添加量、吐温-60、冻融温度及冻融次数进行 $L_{25}(5^6)$ 正交试验。试验方案及结果见表2, 方差分析结果见表3。

表3 正交试验方差分析结果
Table 3 Analysis of variance for the orthogonal array design

因素	偏差平方和	自由度	$F_{比}$	$F_{临界}$	显著性
溶菌酶	4.68×10^6	4	2.385	4.110	
溶菌酶处理时间	3.21×10^6	4	1.635	4.110	
EDTA-2Na	4.46×10^6	4	2.276	4.110	
吐温-60	3.88×10^6	4	1.980	4.110	
冻融温度	1.96×10^6	4	1.000	4.110	
冻融次数	9.79×10^6	4	4.988	4.110	*
误差	1.96×10^6	4			

注: *. 在0.05水平下的显著性。

从表2、3可以看出, 对细胞破碎影响因素主次顺序为 $F > A > B > D > C > E$, 即冻融次数是影响细胞破碎效果的显著性因素, 溶菌酶添加量是次要因素, 反复冻融后细胞膜变得很脆弱, 然后结合酶法和化学渗透法处理, 使细胞膜破碎彻底, 让酶得以释放到细胞外。从表2可以看出, 重组*E. coli*中提取脂肪氧合酶的较佳破碎条件为 $A_2B_4C_4D_4E_1F_2$, 与25组试验中酶活力最高组 $A_2B_3C_4D_5E_1F_2$ 进行验证实验, 在 $A_2B_4C_4D_4E_1F_2$ 该组合条件下测得酶活力为 (6133.07 ± 15.04) U/mL, 低于 $A_2B_3C_4D_5E_1F_2$ 条件下的酶活力 (6840.00 ± 16.03) U/mL, 所以确定重组*E. coli*中提取脂肪氧合酶的最佳破碎条件为 $A_2B_3C_4D_5E_1F_2$, 即溶菌酶添加量1.5mg/mL、溶菌酶处理时间40min、EDTA-2Na添加量2.0mmol/L、吐温-60添加量2%、-70℃冷冻37℃融解、冻融3次。

2.3 酶活性测定方法比较

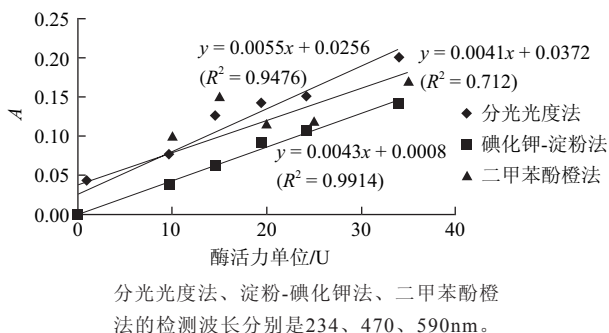


图6 3种酶活力测定方法的比较

Fig.6 Comparison of three methods for determining LOX activity

由图6可知, 3种脂肪氧合酶活力测定方法的相关系数为碘化钾-淀粉法 $>$ 分光光度法 $>$ 二甲苯酚橙法, 即碘化钾-淀粉法线性关系最佳。分光光度法灵敏度虽高, 但在测定过程要严格控制反应温度和时间, 并保持反应体系均相, 且该法不适于浊度较高的LOX粗酶液活性的测定^[22,40]。而二甲苯酚橙法据报道适于LOX活性的高通量筛选^[24-25], 但本实验发现该法酶活测定时缺乏良好的线性

化关系, 测量不准确。相比而言, 碘化钾-淀粉法具备简单、灵敏、快速等特点, 并因测定体系具备肉眼可辨的特征颜色而特别适于LOX的定性分析^[23,41], 且与分光光度法测定的相关系数之间存在着一定的数学关系, 符合食品加工中快速、简单测定LOX活性的要求以及LOX活性高通量筛选, 故选择碘化钾-淀粉法作为LOX活性快速检测的方法。

3 讨论

关于脂肪氧合酶的异源表达研究虽有报道, 但表达量都不高^[42-44]。本实验室实现了*ana-LOX*在大肠杆菌中的高效表达, 并显示出*ana-LOX*基因在食品加工中的巨大应用潜力^[5]。但作为宿主的*E. coli*属于胞内表达, 获得重组蛋白必须经过破壁。从单因素试验和正交试验的结果看, 正交试验所测得的酶活力明显高于单因素试验。因此, 为了更大程度提取脂肪氧合酶, 采用几种细胞破碎方法相互结合的模式也是十分可行的。李永霞等^[45]采用复合破碎方法破碎细胞提取酶, 酶法与反复冻融法、酶法与超声波法、酶法与表面活性剂、酶法与匀浆法及反复冻融法与匀浆法等复合方法分别处理细胞, 确定细胞破碎的最佳方法比之前提高了5.58倍, 而本实验通过优化得到粗酶液的脂肪氧合酶活力比优化前提高了0.44倍。

目前超声破碎法技术成熟, 已广泛应用于破碎各种细胞^[46]。但其在破碎过程中产热及消耗能量, 人们普遍关心的是活性物质在破碎过程中的失活问题, 因此用于释放胞内活性物质的研究引起人们的关注, 国内外有关这方面的有关报道主要集中在有机溶剂、抗生素、表面活性剂、螯合剂、变性剂等化学试剂进行细胞破碎^[47-49]。本实验尝试采用酶解法、反复冻融法和化学渗透法等非机械法破碎重组LOX基因工程菌, 通过单因素试验和 $L_{25}(5^6)$ 正交试验对重组*E. coli*细胞破碎条件进行优化, 建立适用于从重组*E. coli*中提取重组脂肪氧合酶的细胞破碎条件, 在此条件下, 获得粗酶液的脂肪氧合酶活力为6840U/mL与超声破碎法效果相似^[8], 且与超声破碎法相比, 其操作简便有效, 成本低廉, 无需特殊的破碎设备, 易于放大生产规模, 从某种意义上讲对于替代机械法具有较好的实际应用价值和潜力。该研究结果为今后LOX活性高通量筛选以及工业化生产提供参考, 同时也为其他重组*E. coli*蛋白的提取提供了一种新方法新思路。

参考文献:

- [1] 李彩凤, 赵丽影, 陈业婷, 等. 高等植物脂氧合酶研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(10): 143-149.
- [2] 任顺成, 王鹏, 王国良. 添加食用豆粉对小麦粉色泽的影响[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(11): 25-28.
- [3] 陈书婷, 孔祥珍, 华欲飞, 等. 大豆脂肪氧合酶催化合成亚麻酸氢过

- 氧化物的研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(4): 27-30.
- [4] 金孝芳, 童华荣, 刘耀. 茶叶中的脂肪氧化酶[J]. 蚕桑茶叶通讯, 2007, 2(3): 32-33.
- [5] ZHANG Chong, TAO Tingting, YING Qi, et al. Extracellular production of lipoxigenase from *Anabaena* sp. PCC 7120 in *Bacillus subtilis* and its effect on wheat protein[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 94(4): 949-958.
- [6] 张守文, 李丹. 应用混合酶制剂进行面粉品质改良的基础研究[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(1): 16-21.
- [7] GORDON M H, BARIMALAA I S. Co-oxidation of fat-soluble vitamins by soybean lipoxigenase[J]. Food Chemistry, 1989, 32(1): 31-37.
- [8] 张充, 周孝伟, 吕凤霞, 等. 重组鱼腥藻脂肪氧合酶基因的克隆表达、分离纯化及活性分析[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 440-456.
- [9] 吴蕾, 庞广昌, 陈庆森. 高压匀浆破碎螺旋藻细胞释放藻蛋白的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 43-45.
- [10] 赵瑞香, 孙俊良, 于涛. 嗜酸乳杆菌产生 β -半乳糖苷酶活力的测定及数学模型的建立[J]. 食品科学, 2003, 24(12): 53-54.
- [11] 曾敏, 谢为天, 潘丽娟, 等. 鼠李糖乳杆菌细胞破碎方法的比较及其肽聚糖含量的测定[J]. 饲料工业, 2010, 31(8): 31-33.
- [12] 周艳华, 马美湖, 蔡朝霞, 等. 复合酶解可溶性蛋膜蛋白制备多肽的工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 92-97.
- [13] 岳洪霞, 赵祥颖, 田延军, 等. 细胞破碎方法对几丁质脱乙酰酶活力的影响[J]. 山东食品发酵, 2010(1): 3-7.
- [14] 刘建荣, 王慧, 赵晓瑜, 等. 化学渗透法破碎基因重组*E.coli*提取重组人SOD包含体和复性[J]. 高校化学工程学报, 2011, 25(1): 96-101.
- [15] 彭卫民, 商树田, 刘国琴. 钝顶螺旋藻(sp.-D)藻胆蛋白的提取[J]. 食品科学, 1999, 20(6): 48-49.
- [16] 刘建荣, 赵晓瑜, 宋小青, 等. 重组人Cu, Zn-SOD包含体的复性、纯化及复性蛋白稳定性研究[J]. 中国药理学, 2007, 42(13): 969-974.
- [17] LI Q, AUCAMP J, TANG A, et al. Use of focused acoustics for cell disruption to provide ultra scale-down insights of microbial homogenization and its bioprocess impact: recovery of antibody fragments from rec *E.coli*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2012, 109(8): 2059-2069.
- [18] BIAN Xiaoying, HUANG Fan, STEWART F A, et al. Direct cloning, genetic engineering, and heterologous expression of the syringolin biosynthetic gene cluster in *E. coli* through Red/ET recombineering[J]. Journal of Chemical Biology, 2012, 13(13): 1946-1952.
- [19] SCHUMACHER S, JOSE J. Expression of active human P450 3A4 on the cell surface of *Escherichia coli* by autotransport[J]. Journal of Biotechnology, 2012, 161(2): 113-120.
- [20] SCHMIEDL A, BREITLING F, DUBEL S. Expression of bispecific dsFv-dsFv' antibody fragment in *Escherichia coli*[J]. Protein Engineering, 2000, 13(1): 725-734.
- [21] 李会容, 赵昶灵, 杨焕文, 等. 高等植物脂氧合酶活性测定方法的研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(15): 217-223.
- [22] 章栋梁, 钟蔚, 张充, 等. 响应面法优化重组枯草芽孢杆菌产脂肪氧合酶条件[J]. 核农学报, 2012, 26(2): 324-329.
- [23] 钟芳, 王璋, 许时婴. 3种脂肪氧合酶酶活测定方法[J]. 无锡轻工大学学报, 2001, 20(1): 77-80.
- [24] VEGA M, KARNOUNE S, HUSSON F, et al. Optimization of enzymatic assay for the measurement of lipoxigenase activity in organic solvent media[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2005, 82(11): 817-823.
- [25] FUKUZAWA K, SANO M, AKAI K, et al. Measurement of lipid hydroperoxides by the ferric-xylenol orange method (2) application to lipoxigenase assay[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2009, 55(1): 92-98.
- [26] HISATERU M, KYODEN Y, AIJ IRO Y. Study on soybean lipoxigenase[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1967, 31(1): 115-120.
- [27] PELLEGRINI A, THOMAS U, von FELLEBERG R, et al. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative and gram-positive bacteria related to their basic character[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1992, 72(3): 180-187.
- [28] 董卫星, 刘淑鑫, 钟丹, 等. 溶菌酶测定方法的研究进展[J]. 中草药, 2012, 10(1): 58-61.
- [29] 修志龙, 姜炜, 苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向[J]. 化工进展, 1994, 2(1): 15-21.
- [30] MECITOGLU C, YEMENICIOGLU A, ARSLANOGLU A, et al. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging[J]. Food Research International, 2006, 39(1): 12-21.
- [31] MASTROMATTEO M, LUCERA A, SINIGAGLIA M, et al. Synergic antimicrobial activity of lysozyme, nisin, and EDTA against *Listeria monocytogenes* in ostrich meat patties[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(7): 422-429.
- [32] GIACOMINELLI R, MARRUCHELLA G, STORELLI M, et al. 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in the lungs of pigs naturally affected by enzootic pneumonia and porcine pleuropneumonia[J]. Research in Veterinary Science, 2012, 93(2): 898-903.
- [33] 修志, 龙姜炜, 苏志国. 细胞破碎技术的研究进展和发展方向[J]. 化工进展, 1994, 2(1): 15-21.
- [34] 郑江, 许秀美, 王文星, 等. 红毛藻藻蓝蛋白的提取方法研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 27-29.
- [35] 孙利芹, 王长海, 江涛. 紫球藻细胞破碎方法研究[J]. 海洋通报, 2004, 23(4): 71-74.
- [36] 万红贵, 郭一丹, 郑伟刚. 几种细胞破碎方法对提取S-腺苷甲硫氨酸的研究[J]. 食品科技, 2008, 33(9): 171-173.
- [37] 郑江, 许秀美, 王文星, 等. 红毛藻藻蓝蛋白的提取方法研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 27-29.
- [38] 丁文杰, 岳思君, 郭伟, 等. 发状念珠藻不同细胞破碎方法的研究[J]. 现代食品科技, 2009, 25(11): 1243-1245.
- [39] 汤卫华, 岳鹏, 王芑, 等. 三角褐指藻细胞破碎方法的研究[J]. 农产品加工, 2012, 271(2): 48-50.
- [40] 梅伏生, 孟祥高, 赵显珍, 等. 脂氧合酶: 植物抗胁迫响应的关键酶[J]. 华中师范大学学报, 2005, 39(3): 346-354.
- [41] CHUNG L Y, SOO W K, CHAN K Y, et al. Lipoxigenase inhibiting activity of some malaysian plants[J]. Pharmaceutical Biology, 2009, 47(12): 1142-1148.
- [42] SHIRANO Y, SHIBATA D. Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxigenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level[J]. FEBS Journal, 1992, 271(1): 128-130.
- [43] STECZKO J, DONOHO G A, DIXON J E, et al. Effect of ethanol and low temperature culture on expression of soybean lipoxigenase L-1 in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 1991, 2(1): 221-227.
- [44] KOEDUKA T, KAJIWARA T, MATSUI K. Cloning of lipoxigenase genes from a cyanobacterium, *Nostoc punctiforme*, and its expression in *Escherichia coli*[J]. Curr Microbiol, 2007, 54(2): 315-319.
- [45] 李永霞, 曾海英, 秦礼康. 酵母细胞破碎条件优化及高肽酶菌株筛选[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 302-306.
- [46] 戴佳银, 李燕, 马齐, 等. 从毕赤酵母中提取外源重组蛋白的超声破碎条件及优化[J]. 食品科学, 2012, 33(10): 57-60.
- [47] HETTWER D, WANG H. Protein releases from *E.coli* cell permeabilized guanidine-HCl and Triton X-100[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1992, 33(4): 886-890.
- [48] NOVELLA I S, FARGUES C, GRÉVILLOT G. Improvement of the extraction of penicillin acylase from *Escherichia coli* cells by a combined use of chemical methods[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44(3): 379-384.
- [49] FALCONER R J. Chemical treatment of *Escherichia coli*: extraction of intracellular protein from uninduced cells[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 53(3): 453-459.