

酿酒酵母 by1.1b 产 D-(-)-扁桃酸脱氢酶的 发酵条件优化

严 芬 王 茜 林子琳 郭养浩*

(福州大学药物生物技术和工程研究所 福州 350002)

摘要: 对一株产D-(-)-扁桃酸对映选择性脱氢酶的酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1.1b)发酵产酶条件进行了优化。研究各种碳源、氮源及无机盐对产酶的影响,应用正交试验优化发酵培养基组成,结果为:蛋白胨 60 g/L,麦芽糖 30 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, ZnSO₄ 0.01 g/L, KCl 1.0 g/L。优化后酶产量提高了 7.9 倍(由 2.56 U/mL增至 20.21 U/mL)。摇瓶培养最佳条件为:装液量 40%,发酵pH 6.5,接种量 10%,发酵温度 30 °C。考察了细胞生长及产酶的时间进程,最佳培养时间为 25 h。

关键词: D-(-)-扁桃酸, D-(-)-扁桃酸脱氢酶, 酿酒酵母, 产酶条件

Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* sp. Strain by1.1b Culture Conditions for Efficient Biosynthesis of D-(-)-mandelate Dehydrogenase

YAN Fen WANG Qian LIN Zi-Lin GUO Yang-Hao*

(Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, Fuzhou University, Fuzhou, 350002)

Abstract: The culture conditions of *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by 1.1b were optimized for the production of D-(-)-mandelate dehydrogenase which is useful for the asymmetric bioreduction of benzoyl-formate to form D-(-)-mandelate. The optimum medium (per liter) consists of 60 g peptone, 30 g maltose, 0.5 g MgSO₄, 0.01 g ZnSO₄, 1.0 g KCl. After optimization of the culture medium, the enzyme production in shake flasks is enhanced from 2.56 to 20.21 U/L. The optimum fermentation conditions were determined as follows: medium volume 100 mL (i.e., 40% for a 250-mL shake flask), pH 6.5, inoculum size 10 %, temperature 30 °C, and cultivation time 25 h.

Keywords: D-(-)-mandelate, D-(-)-mandelate dehydrogenase, *Saccharomyces cerevisiae* sp., Fermentation condition

生物不对称催化合成已成为有机化学重要的研究方向之一,微生物细胞内酶催化的氧化还原反应

在手性药物中间体和手性药物的生物不对称合成方面有着重要的应用价值, 其中生物催化羰基的不对称还原在不对称合成中占有很重要的地位。目前国内外生物化学家利用酵母细胞在羰基化合物不对称还原方面做了较多工作, 但主要着重于乙酰乙酸酯类和部分芳香酮类化合物的不对称还原^[1-4]。

自 20 世纪 90 年代以来, 手性药物开发已形成热潮, 扁桃酸(mandelic acid)作为一种重要的药物中间体, 在心血管药物环扁桃酯、消炎类药物扁桃酸乌洛托品、镇痛药物扁桃酸苄酯等多类光活性药物的合成中得到应用, 同时在除草剂、燃料、光学拆分等领域也得到开发应用^[5-6]。因此研究开发单构型扁桃酸系列衍生物具有良好的开发前景和巨大的发展空间。国外已对来源于粪链球菌(*Streptococcus faecalis*)、弯曲乳杆菌(*Lactobacillus curvatus*)、红酵母(*Rhodotorula graminis*)等的D-(-)-扁桃酸脱氢酶进行研究^[7-9]。但对于酿酒酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae*)中的D-(-)-扁桃酸脱氢酶国内外未见相关报道。

本课题组筛选出一株酵母菌株(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1.1b), 对底物苯乙酮酸具有较高的转化活力和光学选择性^[10]。本工作在此基础上以酿酒酵母菌株by1.1b为出发菌株, 通过胞内D-(-)-扁桃酸脱氢酶酶活的变化对发酵培养基成分和发酵条件进行优化, 以期提高酿酒酵母by1.1b产D-(-)-扁桃酸脱氢酶的能力, 为有关酶的分离纯化、酶学性质研究及发酵工程菌构建奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 菌种

酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1.1b 为本研究所保藏菌种。

1.2 试剂

苯乙酮酸(纯度>99%)购自台州药业医化有限公司; 还原型 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)购自 Fermentas 公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 培养基

种子培养基(g/L): 蛋白胨 5, 葡萄糖 30, KH_2PO_4 1, MgSO_4 0.5, KCl 0.5。

发酵培养基(g/L): 根据需要, 由种子培养基添加一定量的不同碳源或氮源物质及无机盐组成。

1.4 培养方法

将保存的酵母菌种 by1.1b 接到种子培养基中,

于 30℃、pH 6.5、250 r/min 条件下进行培养。对数生长期中后期的培养物作为种子液, 以 10%的接种量转接入 100 mL/250 mL 的三角瓶发酵培养基中, 根据实验方案改变培养基及培养条件进行发酵条件试验。

1.5 粗酶的制备

取酵母菌培养液, 离心(10 min, 4℃, 4000 g) 获取菌泥。用磷酸盐缓冲液(0.02 mol/L, pH 6.8, 含 1mmol/L 巯基乙醇) 配制菌泥悬浮液, 在冰浴中进行超声波细胞破壁(450 W, 40 min)。将处理后的浆状液离心 10 min (4℃, 15000 g), 收集上清液。加入硫酸铵, 取 20%到 80%饱和度硫酸铵的盐析物, 溶解于磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中, 并对相同缓冲液 4℃透析 24 h, 得粗酶液。

1.6 分析方法

1.6.1 酶活的测定: 在 1 mL 含有 2 mmol/L 底物苯乙酮酸、0.2 mmol/L NADH、0.5 mol/L 磷酸盐的酶活反应液(pH 6.0)中, 加入 50 μL 的酶液, 在 30℃下反应 5 min, 通过记录 NADH 特征吸收峰在 340 nm 处吸光度的变化趋势来测定酶活力。在此条件下, 每分钟消耗 1 μmol NADH 所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.6.2 生物量测定: 取 10 mL 发酵液, 离心分离菌体, 以磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L, pH 6.6) 洗涤, 80℃烘干至恒重, 即为发酵液中的生物量, 以 g/L 计。

2 结果与讨论

2.1 不同碳源对产酶的影响

用无碳源的发酵培养基, 按 30 g/L 的浓度添加葡萄糖、甘油、麦芽糖、蔗糖、淀粉、果糖等各种碳源, 于 30℃、pH 6.5、接种量 10%、转速 250 r/min 条件下摇瓶发酵, 培养 24 h 后离心, 提取粗酶, 测定酶活和生物量(干菌体计), 考察不同碳源对菌体产酶的影响(结果见表 1)。由表 1 可知, 碳源的种类对产酶的影响比对菌体生长的影响大, 其中麦芽糖作为碳源时, 菌体产酶水平最高, 酶活达 6.07 U/mL, 且菌体的生长情况也较好, 干菌重达 16.2 g/L。由于酵母菌对淀粉的利用效果差, 淀粉作为碳源时, 菌体产酶最低且菌体生长情况差。因此选用麦芽糖作为碳源。

2.2 不同氮源对产酶的影响

用无氮源的麦芽糖发酵培养基, 按 20 g/L 的浓度添加硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、蛋白胨、酵母浸膏、玉米浆等各种氮源, 结果如表 2。由表 2 可知, 蛋

白肱等有机氮源作为氮源时, 菌体生长量和产酶水平都较高, 而硝酸铵等无机氮源的效果则次之。其中蛋白肱的效果最佳, 酶活达 5.75 U/mL, 且菌体的生长情况也较好, 干菌重达 16.5 g/L。因此选用蛋白肱作为氮源。

表 1 不同碳源对酶活和生物量的影响
Table 1 Effect of different carbon sources on enzyme activity and cell weight of yeast

碳源 Carbon source	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体干重 Dry cell weight (g/L)
Starch	0.62	7.9
Sucrose	4.10	16.5
Glucose	2.56	16.6
Maltose	6.07	16.2
Fructose	2.85	14.4
Glycerol	3.97	12.8

表 2 不同氮源对酶活和生物量的影响
Table 2 Effect of different nitrogen sources on enzyme activity and cell weight of yeast

氮源 Nitrogen source	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体干重 Dry cell weight (g/L)
NH ₄ NO ₃	2.00	11.2
NH ₄ Cl	1.79	12.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.94	14.4
Cornmeal	4.37	15.9
Yeast extract	2.80	15
Peptone	5.75	16.5

2.3 无机盐对产酶的影响

在含有 30 g/L 麦芽糖和 20 g/L 蛋白肱的发酵培养基中, 按 0.1 g/L 的浓度添加硫酸镁、氯化钙、氯化钾等无机盐(按 0.01 g/L 的浓度添加硫酸亚铁、氯化铁、硫酸锌等微量元素), 结果如表 3。由表 3 可

表 3 不同无机盐对酶活和生物量的影响
Table 3 Effect of different inorganic salts on enzyme activity and cell weight of yeast

无机盐 Inorganic salt	酶活 Enzyme activity (U/mL)	菌体干重 Dry cell weight (g/L)
MgSO ₄	8.94	16.7
CaCl ₂	3.75	12.9
KCl	7.51	15.1
FeCl ₃	4.23	12.6
FeSO ₄	5.35	14.7
ZnSO ₄	10.54	16.6
Control	6.00	16.1

知, 硫酸锌、硫酸镁和氯化钾对菌体产酶有促进作用, 氯化钙、氯化铁、硫酸亚铁等对菌体的生长和产酶都表现出抑制作用。因此选用硫酸锌、硫酸镁和氯化钾作为产酶所需的无机盐。

2.4 培养基正交实验

根据上述实验结果, 选择麦芽糖、蛋白肱、硫酸锌、硫酸镁和氯化钾作为发酵培养基组成。为了研究培养基各成分对产酶的影响, 设计了一个五因素四水平的正交表进行试验。正交试验结果与分析详见表 4 和图 1。从直观图 1 可知, 本实验所设的五个因素对产酶的影响顺序为: B>A>D>C>E, 说明氮源是影响产酶的主要因素, 其次是碳源, 最后才是无机盐; 而无机盐中又以硫酸锌影响最大, 氯化钾影响最小。同时可知, 以 A 因素的水平 3, B 因素的水平 4, C 因素的水平 2, D 因素的水平 2 和 E 因素的水平 3 的组合酶活最高, 即认为 A₃B₄C₂D₂E₃ 为最佳配比。由此我们得到发酵培养基的最佳配方: 蛋白肱 60 g/L, 麦芽糖 30 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, ZnSO₄ 0.01 g/L, KCl 1.0 g/L。

表 4 培养基五因素四水平正交实验
Table 4 The factor-level table of L16(5⁴)

因素 Factor	麦芽糖 Maltose (g/L) A	蛋白肱 Peptone (g/L) B	硫酸镁 MgSO ₄ (g/L) C	硫酸锌 ZnSO ₄ (g/L) D	氯化钾 KCl (g/L) E
水平 Level					
1	10	10	0.1	0.005	0.1
2	20	20	0.5	0.01	0.5
3	30	40	1.0	0.015	1.0
4	40	60	1.5	0.02	1.5

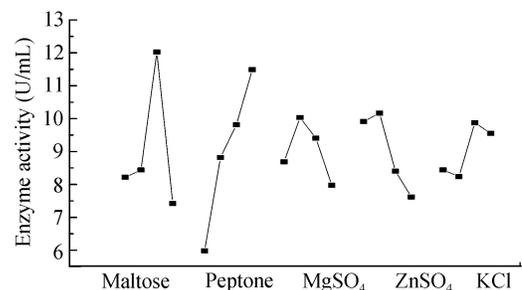


图 1 培养基正交优化趋势图

Fig.1 The pictorial diagram of orthogonal test

2.5 pH 值对产酶的影响

pH 值是影响细胞生长的一个很重要的因素, 发酵液的 pH 值影响菌体的生长, 并对菌体代谢的各种酶的活性有调节作用。将发酵培养基调整至不同 pH 值(5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5), 考察 pH 值对发酵

产酶的影响, 结果如图 2。由图 2 可知, 在本实验的 pH 范围内, 菌体生长的最适 pH 值为 5.5, 而菌体产酶的最适 pH 值为 6.5, 这表明细胞发酵产酶的最适 pH 值与生长最适 pH 值有所不同。

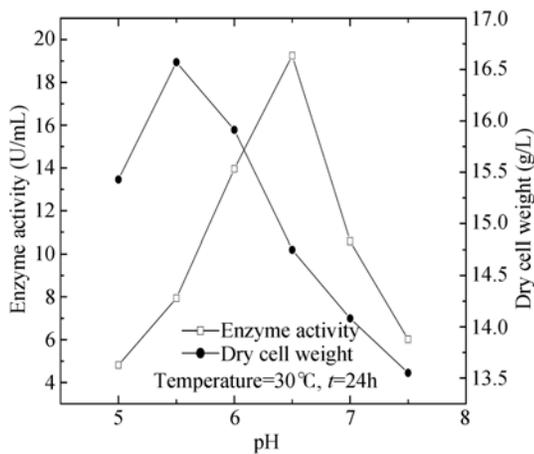


图 2 pH 值对发酵产酶的影响
Fig.2 Effect of pH on enzyme activity and cell weight of yeast

2.6 温度对发酵产酶的影响

由图 3 可知, 在 20℃~30℃之间, 随着温度的升高, 细胞代谢速度加快, 菌体的生物量和酶活都随着提高, 且在 30℃时酶活达到最大值, 而后随着温度进一步升高, 菌体生物量和酶活急速下降。同时实验结果表明, 细胞生长最适温度为 35℃, 高于菌体发酵产酶的最适温度。这可能由于在较低的温度条件下, 可以提高酶所对应的 mRNA 的稳定性, 增加酶生物合成的延续时间, 从而提高酶的产量。

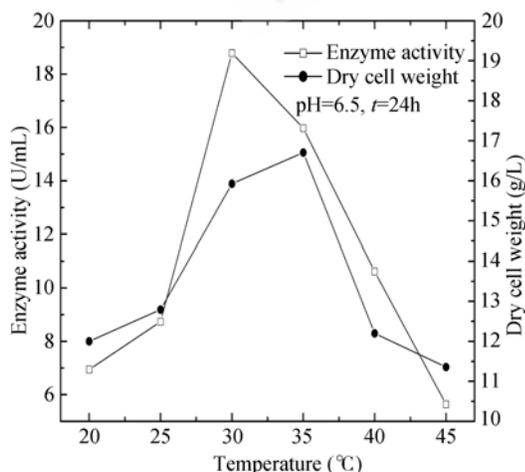


图 3 温度对发酵产酶的影响
Fig.3 Effect of temperature on enzyme activity and cell weight of yeast

2.7 摇瓶装液量对发酵产酶的影响

由图 4 可以看出, 随着培养基装液量的增加(装

液量从 25 mL 增加到 200 mL), 菌体的产酶水平呈现先增加后减少的趋势, 而菌体的生长量则随之不断减少, 当装液量为 100 mL 时, 产酶量最高。这主要是因为本课题中酵母菌种为兼性厌氧菌, 需要适量的溶解氧以维持其代谢和某些代谢产物的合成, 一方面氧气供应太少时会严重影响菌体的生长, 另一方面氧气供应充足会抑制酶的生成。

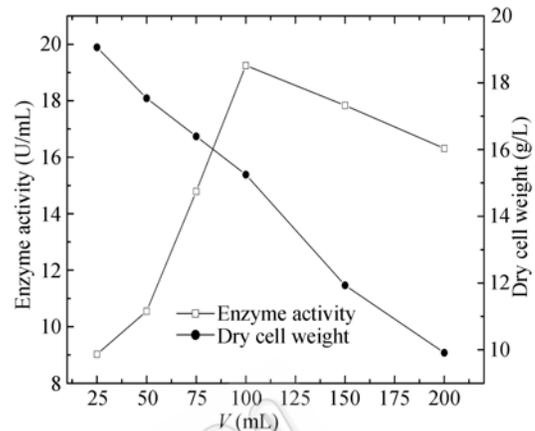


图 4 装液量对发酵产酶的影响
Fig.4 Effect of medium volume on enzyme activity and cell weight of yeast

2.8 菌体生长及产酶的时间进程

菌体生长及产酶曲线的测定, 将有利于我们确定最佳发酵时间、产酶与菌体生长的关系、以及今后的放大培养等等。在温度 30℃、恒定 pH 6.5、接种量 10%、装液量 40%、摇床转速 250 r/min 条件下, 于接种后第 5 h、10 h、15 h、20 h、25 h、30 h、35 h、40 h、45 h、60 h 取发酵液, 离心, 提取粗酶, 测定酶活和生物量, 考察不同发酵时间下菌体生长与产酶的关系, 结果如图 5 所示。由图可知, 在细胞培养初期(0~12 h), 酵母细胞大量生长, 而胞内 D-(-)-扁桃酸脱氢酶活性较低; 在培养 13 h 以后, 即在对数生长期后期和减速期, 扁桃酸脱氢酶才开始大量合成, 并在 25 h 达到最大值; 当细胞进入稳定期后, 酶的合成也随着停止。从产酶过程可见, 其培养较适合的时间为 25 h。优化培养基和培养条件成效较显著, 优化后的发酵液中酶活比未优化前有了显著提高, 由 2.56 U/mL 提高到 20.21 U/mL, 提高了 7.9 倍。

3 结论

以酶产量及菌体生物量作为考察指标, 对酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* sp. strain by1.1b)产 D-(-)-扁桃酸脱氢酶的培养基及培养条件进行了优

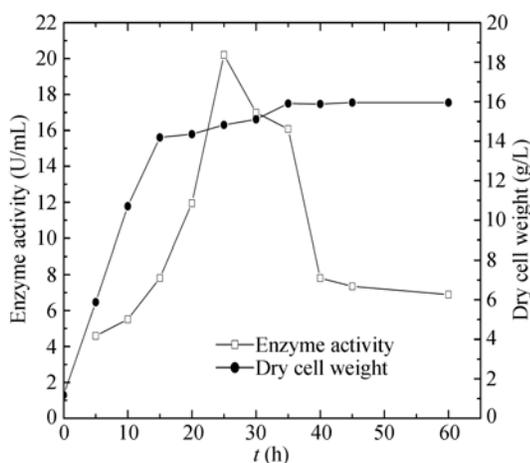


图5 菌体生长及产酶时间曲线

Fig.5 Progress curves of cell growth and enzyme production

化,得到的最佳培养基组成为:蛋白胨 60 g/L, 麦芽糖 30 g/L, $MgSO_4$ 0.5 g/L, $ZnSO_4$ 0.01 g/L, KCl 1.0 g/L。优化后细胞酶产量由 2.56 U/mL 提高到 20.21 U/mL, 提高了 7.9 倍。摇瓶培养的最佳条件为:装液量 40%, 发酵 pH 6.5, 接种量 10%, 发酵温度 30°C。考察了细胞生长及产酶的时间进程, 最佳培养时间为 25 h。

参考文献

- [1] Patel RN. Biocatalytic Synthesis of Intermediates for the Synthesis of Chiral Drug Substances. *Current Opinion*
- [2] Houng JY, Liao JS. Applying Slow-release Biocatalysis to the Asymmetric Reduction of Ethyl 4-Chloroacetate. *Biotechnol Lett*, 2003, **25**(1): 17–21.
- [3] 刘湘, 方志杰, 许建和, 等. 酵母细胞催化芳香酮的不对称还原反应. *催化学报*, 2006, **27**(1): 20–24.
- [4] 马小魁, 王喆之, 陈五岭. 酵母发酵液直接催化 4-氯-乙酰乙酸酯不对称还原生成 4-氯-3-羟基-丁酸乙酯. *催化学报*, 2006, **27**(4): 314–318.
- [5] Oda S, Inada Y, Kobayashi A, et al. Production of Ethyl (R)-2-Hydroxy-4-phenylbutanoate via Reduction of Ethyl-2-oxo-4-phenylbutanoate in an Interface Bioreactor. *Bio-sci Biotechnol Biochem*, 1998, **62**(9): 1762–1767.
- [6] 章思规, 章伟. 精细化学品及中间体手册: 下卷. 北京: 化学工业出版社, 2003, pp.135–136.
- [7] Yamazaki Y, Maeda H. Enzymatic synthesis of optically pure (R)-(-)-mandelic acid and other 2-hydroxycarbonic acids: screening for the enzyme, and its purification, characterization and use. *Agric Biol Chem*, 1986, **50**(10): 2621–2631.
- [8] Hummel W, Schütte H, Kula MR. D-(-)-Mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, **28**: 433–439.
- [9] Baker DP, Fewson CA. Purification and characterization of D-(-)-mandelate dehydrogenase from *Rhodotorula glaucin*. *Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2035–2044.
- [10] 黄雅燕, 肖美添, 李忠琴, 等. R-(-)-扁桃酸脱氢酶产生菌的筛选. *药物生物技术*, 2003, **10**(4): 223–225.

稿件规范化与标准化

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 年用 a; 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: $20\text{cm} \times 0.3\text{cm}$, 不能写成 $20 \times 0.3\text{cm}$; $3^\circ\text{C} \sim 5^\circ\text{C}$ 不可写成 $3 \sim 5^\circ\text{C}$; $3\% \sim 6\%$ 不可写成 $3 \sim 6\%$ 等。