

利用麻风树油驯化筛选高活性脂肪酶产生菌及其催化酯化反应

袁丽红* 黄晶 陆玉婷 周海霞

(南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)

摘要: 以1株分解麻风树油的脂肪酶产生菌 *Pseudomonas* sp. LP-1 为出发菌株, 通过麻风树油定向驯化筛选获得1株酶活较高且产酶稳定的菌株 *P. sp.* X-2-45, 其水解酶活为 29.79 U/mL, 比原始菌株提高了 288%。对 *P. sp.* X-2-45 生长与产酶特征、对植物油脂水解能力及在有机相中催化脂肪酸和有机醇间的酯化反应研究发现, 该菌株生长速率和产酶速率明显加快, 培养 30 h 时生物量和酶活达到最大, 稳定期延长, 培养过程中脂肪酶在培养基中的稳定性提高。以麻风树油诱导合成的 *P. sp.* X-2-45 脂肪酶对麻风树油的水解能力比原始菌株提高了 378%, 说明采用麻风树油定向驯化可提高脂肪酶对相应底物的水解能力。X-2-45 脂肪酶可以催化月桂酸与正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 棕榈酸、硬脂酸与甲醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 油酸与甲醇、正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间发生酯化反应。

关键词: *Pseudomonas* sp., 脂肪酶, 驯化, 麻风树油, 酯化反应

Breeding of High Lipolytical Bacteria by Acclimation to Jatropha Oil and Resultant Strain-catalyzed Esterification Reaction

YUAN Li-Hong* HUANG Jing LU Yu-Ting ZHOU Hai-Xia

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract: A strain, *Pseudomonas* sp. X-2-45, with high and stable lipolytical activity was screened by continuously subculturing a lipase-producing bacterium *P. sp.* LP-1 in culture medium containing Jatropha oil as a sole carbon source. Its hydrolytic activity was 29.79 U/mL, which was increased by 288% as compared to that of parent strain. Furthermore, the growth and lipase synthesis of X-2-45, its catalytic ability to hydrolyze vegetable oils, as well as ester synthesis between fatty acids and organic alcohols were studied. Results showed that rates of bacterial growth and lipase synthesis were significantly raised. Bacterial biomass and lipase activity reached the highest level after 30 h of incubation. Moreover, growth stationary period was prolonged and lipase produced exhibited good stability in culture media during incubation period. Hydrolytic activity of *P. sp.* X-2-45 lipase toward Jatropha oil was increased by 378% as compared to parent strain, suggesting that acclimation to Jatropha oil was an effective approach for improving substrate selectivity of

* 通讯作者: Tel: 86-25-83172082; ✉: yuanlhong@163.com
收稿日期: 2009-05-31; 接受日期: 2009-08-17

lipase. Finally, results of ester synthesis catalyzed by *P. sp. X-2-45* lipase indicated that this lipase could catalyze esterification reactions between lauric acid and *n*-butanol, *n*-octanol, 1-dodecanol or glycerol, palmitic acid or stearic acid and methanol, *n*-octanol, 1-dodecanol or glycerol, oleic acid and methanol, *n*-butanol, *n*-octanol, 1-dodecanol or glycerol.

Keywords: *Pseudomonas. sp.*, Lipase, Acclimation, Jatropha oil, Esterification

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是一类在油/脂-水界面将油脂水解成甘油和脂肪酸的酯键水解酶,普遍存在于微生物和动植物体内。随着对微生物脂肪酶的研究,已发现了多种具有不同酶学性质、底物特异性和催化特性的微生物脂肪酶,它们在水解、酯化、转酯及手性化合物合成等反应中表现出广阔的应用前景^[1,2]。

近年来随着石化资源的枯竭,能源危机愈演愈烈,生物柴油作为可再生的绿色能源受到广泛关注。脂肪酶作为一种良好的酯交换反应生物催化剂用于生物柴油生产,具有反应条件温和、提取简单、醇用量少、甘油易回收、无污染物排放和能耗低等优点,显示出良好的应用前景^[3]。目前生产生物柴油的原料多为大豆油、菜籽油和废弃食用油等,所用的脂肪酶主要来自假丝酵母(*Candida*)、根霉(*Rhizopus*)、毛霉(*Mucor*)和青霉(*Penicillium*)等微生物。不同来源脂肪酶其催化特异性和活性不同。再有,在生物柴油生产过程中脂肪酶对有机溶剂的耐受性和稳定性较差^[4]。在我国西部退耕还林工程中大面积种植的麻风树油料作物也是生产生物柴油的主要原料,但以麻风树油为原料制备生物柴油的脂肪酶尚少见报道。我们在先前研究中从以粉碎的麻风树种子处理半年的土壤中分离出一株分解麻风树油的脂肪酶产生菌 *Pseudomonas sp. LP-1*^[5]。本研究在上述工作基础上以麻风树油作为选择因子对该菌株进行定向驯化,以期得到分解麻风树油能力更强的脂肪酶产生菌,同时对其底物水解特性和催化酯化反应进行研究,为今后以麻风树油为原料酶法生产生物柴油奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: *P. sp. LP-1* 分离自自己粉碎的麻风树种子处理半年的土壤中。

1.1.2 培养基: 驯化培养基(g/L): (NH₄)₂SO₄ 3.0、酵母膏 5.0、MgCl₂ 10.0、麻风树油 20~40, pH 6.5; 平

板初筛培养基(g/L): 蛋白胨 5.0、牛肉膏 3.0、琼脂 15.0、麻风树油 20, pH 7.2; 种子培养基(g/L): 牛肉膏 0.4、蛋白胨 1.0、NaCl 5.0、MgSO₄·7H₂O 0.5、橄榄油或麻风树油 20, 自然 pH; 初筛、复筛和发酵培养基(g/L): 橄榄油或麻风树油 20、(NH₄)₂SO₄ 5.0、酵母膏 5.0、MgCl₂ 5.0, pH 6.5。

1.2 实验方法

1.2.1 *P. sp. LP-1* 定向驯化筛选: 将 *P. sp. LP-1* 接种到驯化培养基中, 30°C、180 r/min 培养 3 d~5 d 转接一次, 驯化 270 d 后于营养琼脂培养基上涂布分离, 待长出单菌落后随机挑取 1000 株点种于初筛平板上, 30°C 培养, 观察菌落周围出现水解圈的时间及大小, 选择水解圈大的 300 株菌继续点种于初筛平板上, 与第 1 次平板初筛结果对比选择水解圈大的 100 株菌进行摇管初筛, 最后挑选 30 株进入复筛, 复筛时每个菌株重复 3 次。培养条件为接种量 10%, 35°C 振荡培养 36 h, 转速 180 r/min。

1.2.2 产酶稳定性实验: 复筛得到的菌株在营养琼脂斜面上连续转接 16 次(每 24 h 转接 1 次), 每转接 4 次接种于发酵培养基中培养 36 h 测定酶活, 考察其产酶的稳定性, 连续测 4 次。

1.2.3 菌株对植物油脂水解能力比较: 发酵培养基中分别以橄榄油和麻风树油作为碳源, 培养 36 h。选择橄榄油、麻风树油、大豆油等植物油脂为底物, 采用醋酸铜比色法测定脂肪酶水解活性。以橄榄油诱导产生的脂肪酶对橄榄油的水解活性为 100%。

1.2.4 驯化菌产生脂肪酶的酯化反应: 参照 Georgina 方法^[6]。10 mL 正己烷中加入待反应的有机醇和有机酸(均为 0.05 mol/L), 2 mL 培养 36 h 菌液, 40°C 下反应 48 h。用 TLC 法检测酯化反应产物。硅胶 G 薄层色谱板, 展开剂为石油醚:乙醚:冰乙酸(70:30:1), 碘蒸气显色。

1.2.5 脂肪酶水解活性测定-醋酸铜比色法: 发酵液于 4°C、8000 r/min 离心 15 min, 上清液即为脂肪酶酶液。3 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)与 1 mL 橄榄油混合均匀预热 5 min, 加 1 mL 酶液, 于 35°C、

200 r/min 水浴摇床中反应 10 min 后立即加入 8 mL 苯萃取, 静置分层后取上层有机相 4 mL, 加 1 mL 4% 醋酸铜显色剂(4 g 醋酸铜溶于 100 mL 蒸馏水中, 用吡啶调 pH 6.1), 充分混合, 静置, 取上层测 OD_{710} , 以灭活酶液为参照。酶活单位定义为上述条件下每分钟催化底物水解产生 1 μmol 脂肪酸为 1 个酶活单位(U)。以油酸为脂肪酸检测的标准品。

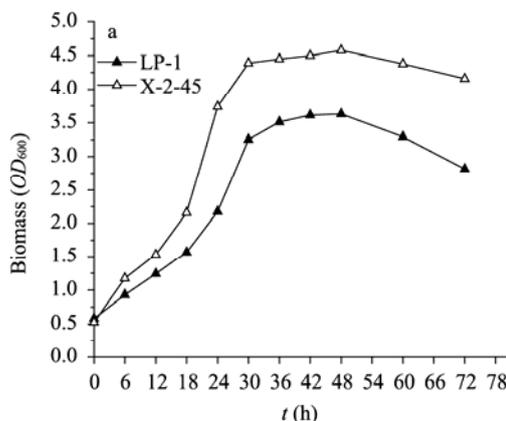
2 结果与讨论

2.1 *P. sp.* LP-1 定向驯化

表 1 为 *P. sp.* LP-1 经过麻风树油定向驯化 270 d 后筛选获得的 6 株脂肪酶活性显著提高的菌株, 其中 X-2-45 酶活为 29.79 U/mL, 比原始菌株 LP-1 提高了 288%。进一步考察 X-2-45 菌产酶稳定性(表 2), 结果发现经过连续 16 次转接其酶活稳定在 30 U/mL 左右, 未见明显波动, 说明经麻风树油定向驯化筛选获得的菌株具有良好的遗传稳定性。

| 菌株 Strains | LP-1 | X-2-144 | X-2-45 | X-1-46 | X-3-281 | X-3-98 | X-2-101 |
|-------------------------------------|------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|
| 酶活 (U/mL) Lipase activity (U/mL) | 7.68 | 20.52 | 29.79 | 14.38 | 18.67 | 16.71 | 18.89 |

| 传代次数 Passages | 4 | 8 | 12 | 16 | Average |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 酶活(U/mL) Lipase activity (U/mL) | 30.19 | 28.63 | 29.83 | 32.16 | 30.20 |



2.2 驯化菌 *P. sp.* X-2-45 生长及产酶特征

比较了驯化菌 *P. sp.* X-2-45 和原始菌 *P. sp.* LP-1 生长及产酶特征, 结果(图 1)发现 X-2-45 生长速度显著提高, 培养约 30 h 时生物量基本达到最大, 稳定期较原始菌明显延长。同样, 其产酶速率也显著提高, 产酶高峰提前, 培养 30 h 时脂肪酶活性达到最大, 并且在培养 30 h~48 h 内酶活未见明显下降。而原始菌培养 36 h 酶活达到最大, 随后酶活迅速下降, 这一结果说明通过采用麻风树油定向驯化策略不仅提高了驯化菌脂肪酶活性, 而且也提高了脂肪酶在发酵培养基中的稳定性, 这可能是由于麻风树油的定向驯化也同时降低了驯化菌合成蛋白酶能力的缘故, 从而使得驯化菌合成的脂肪酶未被或很少被蛋白酶立即降解。实验中我们也比较了驯化菌 X-2-45 和原始菌 LP-1 在发酵过程中蛋白酶活性差异, 发现驯化菌蛋白酶活性显著低于原始菌蛋白酶活性(数据未显示)。

2.3 驯化菌 *P. sp.* X-2-45 脂肪酶对植物油脂底物的水解能力

以橄榄油或麻风树油为唯一碳源培养驯化菌和原始菌, 培养 36 h 测定合成的脂肪酶对橄榄油、麻风树油、大豆油、菜籽油、向日葵油和黄连木油等 6 种植物油脂的水解能力, 结果见图 2。

从图 2 可以看出, 以橄榄油为碳源时驯化菌 X-2-45 合成的脂肪酶对橄榄油等 6 种植物油脂水解能力不同, 其中对橄榄油、麻风树油和大豆油的水解能力显著提高, 与驯化前相比分别提高了 278%、198%和 57%, 而对菜籽油、向日葵油和黄连木油的水解能力未见明显提高; 以麻风树油为发酵培养基碳源时, X-2-45 脂肪酶对植物油脂水解能力除葵花

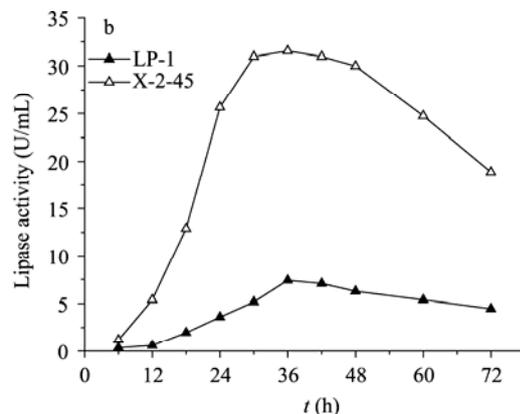


图 1 *P. sp.* X-2-45 和 *P. sp.* PL-1 生长和产酶特征

Fig. 1 Time courses of the growth and lipase production of *P. sp.* X-2-45 and *P. sp.* PL-1

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

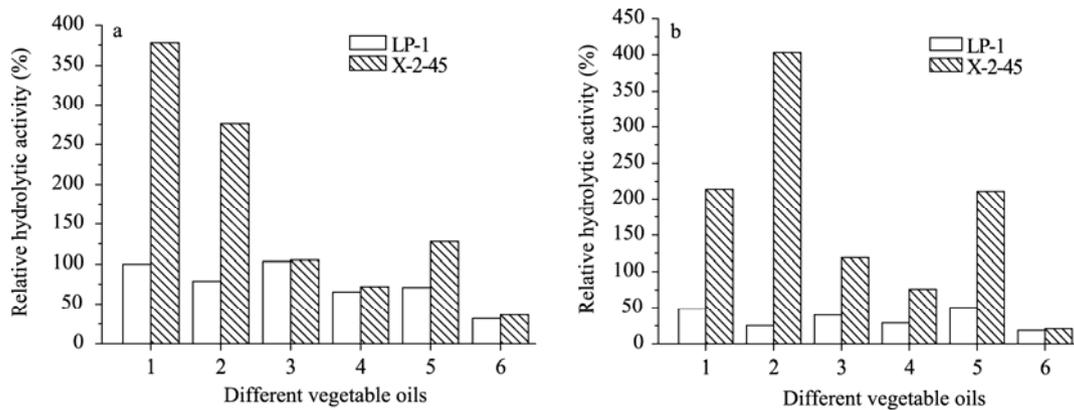


图 2 X-2-45 和 PL-1 脂肪酶对不同植物油脂水解能力

Fig. 2 Hydrolytic activities of *P. sp. X-2-45* lipase and *P. sp. PL-1* lipase toward different vegetable oils

注: a: 橄榄油为产酶碳源; b: 麻风树油为产酶碳源; 1: 橄榄油; 2: 麻风树油; 3: 菜籽油; 4: 黄连木油; 5: 大豆油; 6: 向日葵油。

Note: a: Olive oil as carbon source; b: Jatropha oil as carbon source; 1: Olive oil; 2: Jatropha oil; 3: Rapeseed oil; 4: Pistacia oil; 5: Soybean oil; 6: Sunflower oil.

籽油外均有明显提高, 其中对麻风树油的水解能力最强, 比驯化前提高了 378%, 其次为橄榄油和大豆油, 再次为菜籽油和黄连木油。对比 2 种碳源诱导产生的脂肪酶, 发现驯化前的原始菌株无论以橄榄油为碳源, 还是以麻风树油为碳源合成的脂肪酶的最佳水解底物并不是麻风树油, 麻风树油也不是诱导产酶的最佳碳源, 而驯化后的菌株以麻风树油为碳源时产生的脂肪酶对麻风树油的水解能力最强, 相对水解能力达 403%, 比对橄榄油的水解能力提高了 189%, 这一结果一方面说明了采用麻风树油定向驯化可提高其脂肪酶对相应底物的水解能力, 另一方面也说明麻风树油已成为驯化菌产酶的最佳碳源。另外, 橄榄油和麻风树油诱导产生的脂肪酶对不同植物油脂水解能力的差异也说明本研究所用的菌株由不同诱导物诱导合成的脂肪酶具有不同性质, 它们可能为同工酶。Helmy 等^[7]报道培养基的营养物质影响合成的脂肪酶性质。Lanset 等^[8]和 Stránský^[9]等也报道培养基组成影响所产生的脂肪酶的类型, 脂肪酶对不同底物水解能力差异与合成的脂肪酶同工酶类型有关。

2.4 驯化菌 *P. sp. X-2-45* 脂肪酶催化酯化反应

驯化菌 X-2-45 脂肪酶催化月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸等脂肪酸与甲醇、正丁醇、正辛醇、月桂醇、丙三醇等有机醇之间酯化反应结果见表 3。从表 3 可以看出, 除了月桂酸与甲醇、硬脂酸和棕榈酸与正丁醇之间较难发生酯化反应外, 月桂酸与正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 棕榈酸和硬脂酸与甲醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 油

酸与甲醇、正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间均可在 X-2-45 脂肪酶催化下发生酯化反应。图 3 为油酸与月桂醇酯化反应产物 TLC 检测结果, 若在 254 nm 下观察, 月桂醇呈现出微弱的荧光斑点。反应产物样比底物样多出一个斑点, 初步判断产物中有油酸月桂醇酯的生成。

3 结论

以麻风树油为选择因子对一株分解麻风树油的脂肪酶产生菌进行连续驯化, 经过 270 d 驯化培养分离筛选出 1 株脂肪酶活性显著提高的菌株 X-2-45, 其水解活性比原始菌株提高了 288%。经过连续 16 次转接酶活稳定在 30 U/mL 左右, 具有较好的遗传稳定性。对 X-2-45 生长及产酶特征研究发现其生长和产酶速率显著提高, 培养 30 h 时菌体生物量和酶活达到最大, 稳定期明显延长, 培养过程中脂肪酶

表 3 X-2-45 脂肪酶催化的酯化反应
Table 3 Ester synthesis catalyzed by X-2-45 lipase

| | 甲醇 Methanol | 正丁醇 <i>n</i> -butanol | 正辛醇 <i>n</i> -octanol | 月桂醇 1-dodecanol | 丙三醇 Glycerol |
|----------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|-----------------|
| 月桂酸 Lauric acid | - | + | + | + | + |
| 棕榈酸 Palmitic acid | + | - | + | + | + |
| 硬脂酸 Stearic acid | + | - | + | + | + |
| 油酸 Oleic acid | + | + | + | + | + |

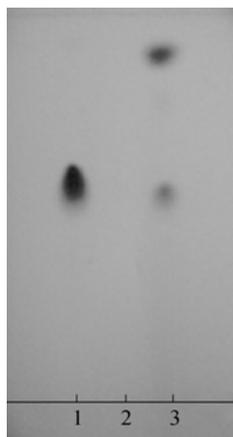


图3 X-2-45 脂肪酶催化的酯化反应产物薄层色谱图
Fig. 3 TLC of product of esterification reaction catalyzed by X-2-45 lipase

注: 1: 油酸; 2: 月桂醇; 3: 酯化反应产物.

Note: 1: Oleic acid; 2: 1-dodecanol; 3: Reaction product.

在培养基中的稳定性提高。驯化菌 X-2-45 在以麻风油为唯一碳源培养基中诱导合成的脂肪酶对麻风油的水解能力显著提高, 比原始菌株 LP-1 提高了 378%。X-2-45 脂肪酶可以催化月桂酸与正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 棕榈酸、硬脂酸与甲醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间, 油酸与甲醇、正丁醇、正辛醇、月桂醇和丙三醇之间发生酯化反应。

参考文献

[1] Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. Bacterial biocatalysts:

molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 1999, **53**: 315–351.

[2] Arpigny JL, Jaeger KE. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemistry Journal*, 1999, **343**: 177–183.

[3] 刘汝宽, 李太友, 王瑞霞, 等. 制备生物柴油的催化剂研究进展. *中国粮油学报*, 2006, **21**(3): 273–276.

[4] Yuji S, Yomi W, Akio S, *et al.* Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **17**: 133–142.

[5] 周海霞, 袁丽红, 欧阳平凯. 产脂肪酶假单胞菌的分离培养及最佳产酶条件研究. *现代生物医学进展*, 2008, **8**(2): 259–262.

[6] Georgina S, Alain M. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, **40**: 390–393.

[7] Helmy M, El-Adl N. One-step purification of a *Pseudomonas pseudoalcaligenes* lipase induced by a specific substrate. *Journal of Biochemistry(Tokyo)*, 2007, **141**: 101–108.

[8] Lanset AC, Manthey LK, Hou CT. Regioselectivity of new bacterial lipases determined by hydrolysis of triolein. *Current Microbiology*, 2002, **44**: 336–340.

[9] Stránský K, Zarevúcka M, Kejík Z, *et al.* Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum sp.* *Biochemical Engineering Journal*, 2007, **34**: 209–216.

编辑部公告

关于《微生物学通报》专题刊申请的通知

当前, 随着生物技术的飞速发展, 微生物学涵盖的领域越来越广, 交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的微生物学、病毒学、基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外, 基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制、生物质能等也逐步成为微生物学研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果, 以及该领域学科的热点难点问题, 充分发挥《微生物学通报》的学科引领和导向作用, 促进学科发展, 为某个领域的科研人员提供一个交流的平台, 《微生物学通报》编委会决定自 2008 年起, 每年出版一定数量的专题刊。专题刊将系统地反映微生物学相关领域或新学科生长点的最新进展, 及时介绍国内外微生物相关前沿领域的突破性成果, 以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人, 申请并组织专题刊。申请得到编委会批准后, 申请人将被邀请担任本专题刊的特邀编辑, 负责组织稿件、确定审稿专家, 并撰写专题刊序言。

根据专刊工作计划, 现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定附在通知的下面, 请申请者仔细阅读;
2. 提交形式: 请到我刊主页(<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>)的“下载专区”下载专题刊申请表; 填写好之后, 以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: tongbao@im.ac.cn, 并在邮件主题中注明: “专题刊申请”字样;
3. 申请者如有疑问, 请咨询编辑部, 联系方式: 邮件 tongbao@im.ac.cn 或电话 010-64807511

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>