

产有机相催化酯合成活性的脂肪酶菌株的筛选

袁红玲 汤鲁宏 许正宏 陶文沂*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214036)

摘要: 通过添加 10g/L 的甲苯作为唯一碳源进行预培养, 然后以透明圈平板筛选法从土壤样品中成功地筛选到了一株耐有机溶剂的产脂肪酶的酵母菌 A213, 初步鉴定为耶罗威亚酵母 (*Yarrowia* sp.)。摇瓶实验表明, A213 适宜的产酶培养基为 (g/L): 酵母膏 40g, 橄榄油 10g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, KH_2PO_4 5g, 最佳培养条件为 27℃、初始 pH 6.5。脂肪酶活力最高可达 67.8 IU/mL; 该酶最适作用温度为 40℃, 最适作用 pH 为 6.5, 在 70℃ 以下, pH 5.5 ~ 8.5 范围内稳定, 能直接在叔戊醇溶剂中催化合成 L-抗坏血酸棕榈酸酯。

关键词: 有机溶剂, 脂肪酶, 菌种选育, 酶学性质

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0019-05

Screening of Lipase-producing Strain for Catalytic Synthesis of Ester in Organic Media

YUAN Hong-Ling TANG Lu-Hong XU Zheng-Hong TAO Wen-Yi*

(The key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

Abstract: An organic solvent tolerant isolate A213 originating from soil samples were successfully isolated via direct plating method using 10g/L of toluene as the sole carbon source and transparent cycle plate assay method. It was identified as *Yarrowia* based on its characteristics. The results in shake flask cultivation showed that the suitable lipase producing media were (g/L): yeast extract 40, vegetable oil 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, KH_2PO_4 5. Under optimal culture conditions (27℃ and pH 6.5), the maximal lipase activity could reach 67.8 IU/mL. The optimal pH and temperature for the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by crude lipase were pH6.5 and 40℃. The enzyme was stable under 70℃ and pH 5.5 ~ 8.5. Then isolate A213 was found to produce the lipase which can synthesize L-ascorbyl palmitate in tert-amyl alcohol validated by the thin-layer chromatography.

Key words: Organic phase, Lipase, Screening, Properties

脂肪酶 (EC3.1.1.3) 是类脂化合物分解、合成和酯交换的催化剂, 有机相中脂肪酶可以完成酯化、交换及转酯等反应, 具有区域选择性、立体选择性、较高的稳定性; 尤其是它的立体选择催化特性, 可以完成用化学法难以进行的消旋化化合物的拆分、不对称合成等, 使这一古老的酶种有着崭新而广阔的发展前景^[1]。由于酶在非水介质中反应具有水溶液介质中酶促反应无法比拟的优点, 人们对非水溶液的酶催化反应研究也就越来越感兴趣。但是由于蛋白质、酶在生理过程中都处于水环境中, 水在酶的生理催化过程中具有重要作用, 而有机溶剂则易引起蛋白质的变性, 使酶失活, 因此以往几乎所有的酶催化反应研究

都是在酶的水溶液中的进行的。然而, 由于许多有机化合物在水中的溶解度较低, 而较易溶于有机溶剂中, 而且有机合成大多数是在有机介质中进行的, 因此限制了酶在有机合成中的应用。目前用于非水相中的酶大多数都是将酶经过适当的预处理, 如将酶溶于表面活性剂中, 形成逆向胶囊或固定化于疏水性载体上然后置于无水有机溶剂中催化有机反应^[2]。作者通过添加 10g/L 的甲苯作为唯一碳源进行预培养^[3], 然后以透明圈平板筛选法筛选出一株耐有机溶剂的产脂肪酶的酵母菌株 *Yarrowia* sp. A213, 其产酶能力能够达到 67.8 IU/mL, 并且能直接在叔戊醇溶剂中合成 L-抗坏血酸酯。

* 通讯作者 Tel: 0510-85860721, E-mail: wytiao@sytu.edu.cn

收稿日期: 2006-02-28, 修回日期: 2006-06-02

1 材料与方法

1.1 样品

从油脂含量较为丰富的地点采集土样,采集地点分别为无锡市金禾油脂厂、无锡肉联厂、北京中国煤炭科学研究总院焦化研究室等地。

1.2 培养基及培养条件

基本培养基: K_2HPO_4 5 g, NH_4Cl 10 g, Na_2SO_4 20 g, KNO_3 20 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g, 甲苯 10 g, 定容至 1L。

富集培养基组成: 橄榄油 20 g, 蛋白胨 10 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g, K_2HPO_4 5 g, 定容至 1L, pH7.0, 37℃, 150r/min 摇瓶培养。

选择性培养基组成及制备: 酵母浸膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 橄榄油 25 g, 琼脂 20 g, 定容至 1L, pH7.0。

斜面培养基组成: 橄榄油 1 g, 蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 20 g, 定容至 1L, pH7.0。

复筛培养基组成: 蛋白胨 5 g, 橄榄油 20 g, 酵母浸膏 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, K_2HPO_4 5 g, 定容至 1L, pH6.5, 37℃, 150r/min 摇瓶培养。

种子培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母粉 2 g, 定容至 1L, pH 自然, 挑取单菌落接入液体种子培养基内, 置 27℃, 150 r/min 下培养 24h。

发酵培养基: 橄榄油 10 g, 酵母浸膏 40 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g, K_2HPO_4 5 g, 定容至 1L, 将种子液按 5% 接入发酵培养基中, 27℃, 150 r/min 下培养, 定时检测酶活。

1.3 以甲苯为唯一碳源产脂肪酶菌株的筛选方法

取 1 g 土样加入 10 mL 基本培养基中, 30℃ 培养 5~7 d, 每天摇动 2~3 次, 逐日观察, 把培养液变浑的菌液吸取 1 mL 悬浮液装入盛有 30 mL 富集培养液的 250 mL 三角瓶中, 150 r/min, 30℃ 培养 3~5 d, 更换新的培养基继续培养, 重复 4~5 次后稀释涂布于选择性平板上, 30℃ 培养 72 h 后将透明圈较大的菌落挑到斜面上保藏。

1.4 水相中脂肪酶活力测定方法^[4]

取对硝基苯乙酯溶于无水乙醇中, 配制成 2.5 mmol/mL 底物溶液, 在 3 mL 比色皿中加入

2.85 mL, pH 6.5 的磷酸盐及 0.1 mL 底物溶液, 37℃ 保温 2 min, 加入 0.05 mL 发酵上清液, 继续在 37℃ 下保温 10 min, 于 410 nm 下测定酶催化反应的对硝基苯酚的吸收值 ($\epsilon = 14200$), (以不加酶的溶液做对照)。脂肪酶的 1 个单位的定义是: 每分钟产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.5 非水相中脂肪酶催化能力的检测^[5]

在 250 mL 具塞三角瓶中, 分别加入 0.21 g/L 抗坏血酸和 20 mL 氢化棕榈油相应的叔戊醇溶液 (0.1 mol/L), 再按脂肪量的 5% 添加脂肪酶, 在 55℃, 常压下, 置于水浴振荡器上在 200 r/min 速度下旋转振荡反应, 3 h 后取样进行薄层层析分析。展开剂为氯仿-甲醇-冰醋酸-水 (80:10:8:2, v/v/v/v); 展开后用 1% 2, 6-二氯酚酞乙醇溶液显色。将喷涂显色剂后的薄板置于 105℃ 下加热 7 min。取出后, 立即于白色斑点处滴加液体石蜡的己烷溶液保护, 置于 365 nm 波长的紫外光下观察黄色荧光。

1.6 有机相中脂肪酶活力的测定方法^[6,7]

取对硝基苯乙酯溶于正庚烷溶液中, 配制成 50 mmol/mL 底物溶液, 在小试管内加入 2 mL 底物溶液, 加入 10 mg 粗脂肪酶, 在 37℃, 150 r/min 下反应 10 min, 然后 3,000 r/min 离心 1 min, 取上清液 1 mL 加入 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液 2 mL, 此时被释放的对硝基酚被水相萃取出来, 于 410 nm 下测定酶催化反应的对硝基苯酚的吸收值 ($\epsilon = 14200$), (以不加酶的溶液做对照)。脂肪酶的 1 个单位的定义是: 每分钟产生 1 μmol 的对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活单位。

1.7 有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响^[8,9]

在 1L 圆底烧瓶中, 加入 600 mL 0.1 mol/L 氢化棕榈油的叔戊醇溶液, 20 g L-抗坏血酸, 5 g 粗脂肪酶, 置于 55℃ 水浴中, 常压, 200 r/min 速度下搅拌反应, 9 h 后将反应混合物倾出, 而将脂肪酶保留在反应容器中。反应混合物取样进行定量测定后, 负压浓缩回收反应介质叔戊醇。回收的叔戊醇经添加新鲜叔戊醇和氢化棕榈油, 构成下一个批次的反应溶液, 连同留在反应容器中的固定化酶, 和适量补足的 L-抗坏血酸, 构成新一轮的反应体系继续下一个批次的反应。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

在有机溶剂存在时,大多数的微生物代谢功能几乎丧失并停止生长,而且酶在有机溶剂中变性或失活,文献表明耐有机溶剂的菌株所产的酶会在一定程度上耐有机溶剂并且可以工业化利用^[3]。按照方法1.3,对土样样品进行大量的分离筛选工作,经纯化分离,得到17株耐有机溶剂菌株,其中A213菌株生长较旺盛透明圈较明显,菌株A213在平板上于30℃培养72 h后,菌落奶酪状,奶白色,边缘波浪状,有树根状隆起;细胞卵形,单极全壁芽殖,有假菌丝,初步鉴定为耶罗威亚酵母(*Yarrowia* sp.)。

2.2 菌株A213培养条件的确定^[10]

2.2.1 碳源的影响:分别在发酵产酶培养基中添加不同碳源,测定酶活。在不同的培养基中,A213产酶能力有很大的差别(表1)。结果表明,培养基中的碳源对该酵母菌的脂肪酶产率影响很大,当用棕榈酸或橄榄油做碳源,菌株产酶较好,油脂除作为碳源外,显然还对脂肪酶的形成具有诱导作用。以淀粉、葡萄糖、蔗糖等碳水化合物做碳源时,不利于脂肪酶的生产,低浓度的糖做碳源时,脂肪酶酶活很低,但当浓度提高时,几乎没有酶活,因此用10g/L的橄榄油做碳源。

表1 碳源对产酶的影响

碳源	浓度(g/L)	酶活力(u/mL)
葡萄糖	5	9.87
	10	0.80
	20	0
蔗糖	5	1.27
	10	0
	20	0
棕榈酸	5	2.20
	10	4.33
	20	10.40
橄榄油	5	5.40
	10	21.20
	20	9.70
淀粉	5	1.80
	10	0
	20	0

2.2.2 氮源的影响:以10 g/L 橄榄油做碳源,在发酵产酶培养基中选用酵母膏、蛋白胨、玉米浆、牛肉膏和(NH₄)₂SO₄作为氮源,研究氮源对菌株

产酶的影响,实验结果如表2。结果表明,氮源对脂肪酶的酶活影响不大,结合经济因素因此用40 g/L 酵母膏做氮源。

表2 氮源对产酶的影响

氮源	浓度(g/L)	酶活力(u/mL)
酵母膏	20	17.00
	40	35.80
	60	37.00
蛋白胨	20	23.60
	40	7.73
	60	28.33
玉米浆	20	15.67
	40	7.27
	60	1.00
牛肉膏	5	7.33
	10	10.67
	20	14.00
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	7.62
	15	12.42
	20	3.18

2.2.3 初始pH的影响:分别对培养基pH 5.0到pH 9.0进行初始pH对产酶的影响实验,结果表明(图1):培养基初始pH 6.0~6.5时产酶活性最高。

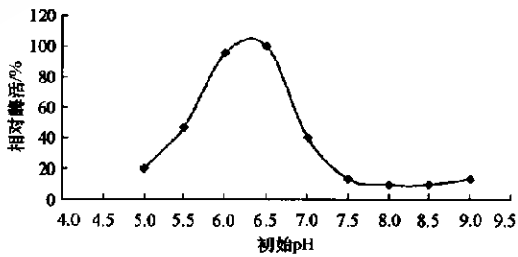


图1 初始pH对产酶的影响

2.2.4 培养时间的影响:图2为摇瓶中的典型产酶进程。从图中可以看出,发酵24 h时酶活力最大,

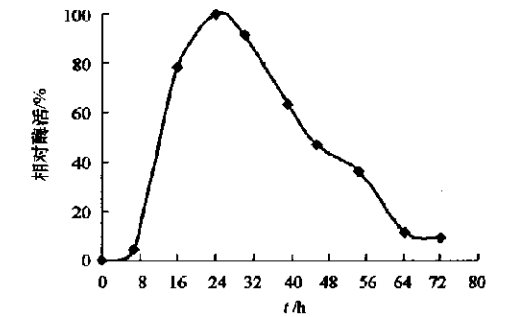


图2 产酶的时间进程

24 h 后酶活迅速下降。实验表明：该菌株的产酶周期较短。

2.2.5 培养温度的影响：对菌株在不同温度下进行培养（22℃，27℃，30℃，37℃）24 h 后，测定酶活，研究培养温度对产酶的影响实验，实验结果表明，27℃ 为该菌的最适培养温度，并且当温度大于 30℃ 时对产酶不利，如图 3。

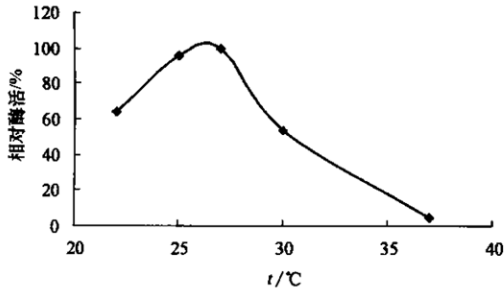


图3 温度对产酶的影响

2.3 脂肪酶的基本性质

菌株在 27℃ 摇瓶培养 24 h 后，6,000 r/min，离心 10 min 去菌体，上清液中加入 40% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉降酶蛋白，离心收集沉降物后，用透析膜透析，再用聚乙二醇包埋法和冷冻干燥法制取酶粉。

2.3.1 酶作用的最适 pH：以硝基苯乙酯为底物，用不同 pH 的磷酸盐缓冲液溶解粗酶粉，在 37℃ 反应 10 min，测定脂肪酶活力，以测定的最高酶活力为 100%，实验结果表明，酶的最适 pH 为 6.5。随着 pH 值得增加，相对酶活逐渐减小。

2.3.2 酶作用的最适温度：在 pH 6.5 的磷酸盐缓冲溶液中，将酶液置于不同温度下保温 10 min，实验表明该脂肪酶的最适温度为 40℃，在 37℃ ~ 50℃ 范围内酶活力保持 80% 以上。

2.3.3 温度对脂肪酶稳定性的影响：将粗酶粉加入到 pH 6.5 的缓冲溶液中，分别在 40℃，50℃，60℃，70℃ 水浴中分别保温 2 h，每隔 20 min 测定酶活力。由实验结果可以看出，该酶在 70℃ 2 h 酶活力为 20% 以上，40℃ 40 min 酶活力为 50%；50℃ 保温 30 min，酶活力下降到 50%；60℃，18 min 时迅速下降到 50%；而在 70℃，100 min 后酶活几乎为 0。

2.3.4 pH 对脂肪酶稳定性的影响：取粗酶粉加入到不同 pH (pH 5.0 ~ 10.0) 的缓冲液以 1:5 的比

例混和，并在 4℃ 保存 48 h，然后再将酶液调回到最适 pH，按照标准测定酶活。结果表明，在 pH 5.5 ~ 8.5 范围内，48 h 后酶活力下降不大，其中在 pH 7.5 时最稳定。

2.4 脂肪酶的特殊性质

2.4.1 非水相中有活性的脂肪酶的定性检测：在叔戊醇溶液中，用该菌株 A213 产的脂肪酶粗酶粉催化 L-抗坏血酸和氢化棕榈油，反应 3 h 后，反应混合物经薄层层析分析，均观察到了代表产物生成的双黄色荧光斑点，如图 4 所示。基线附近的黄色荧光斑点是由溶解于反应体系中但未发生反应的 L-抗坏血酸所形成（因缺乏脂溶性 L-抗坏血酸在该展开体系中基本保持不动）的，而位于薄板中部的黄色荧光斑点则是由反应生成的 L-抗坏血酸棕榈酸酯所形成（没有酯的生成不会有该斑点出现）的。

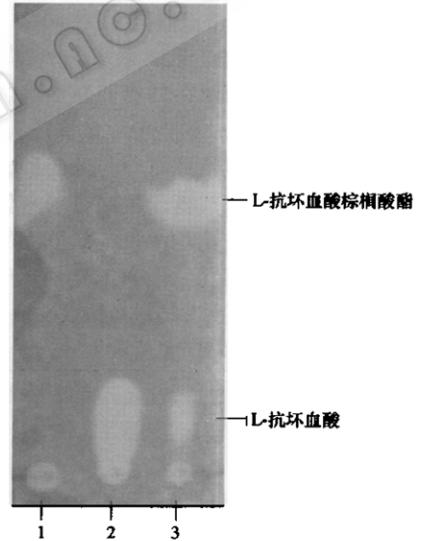


图4 快速检测有机相中有活性的脂肪酶的薄层层析法
1 L-抗坏血酸棕榈酸酯标样，2 L-抗坏血酸标样，3 反应混合物

2.4.2 有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响：脂肪酶的使用寿命是决定工业化过程生产成本的一个重要影响因素。我们以氢化棕榈油为底物，对该合成反应中酶的使用寿命做了初步的探讨，进行了一次连续 10 次合成反应的实验，结果见图 5。

2.4.3 活性比值 $R_{O/A}$ ：由于在水相和有机相中反应条件相同，因此我们使用活性比值 $R_{O/A}$ 来描述酶在有机相中的活性。根据方法 1.4 和 1.6 测得此

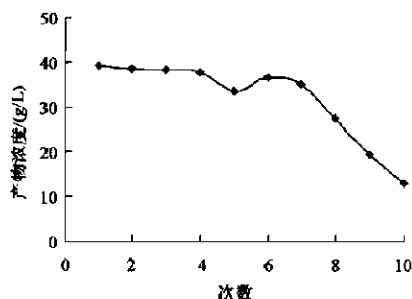


图5 有机溶剂对脂肪酶稳定性的影响

脂肪酶的 $R_{0/A}$ 是 0.78。有许多原因导致酶在有机相中的活性很低。首先,有效水的含量可能太低而不能很好的反应。其次,酶分子的结构柔韧性在有机相中要比在水中低,这将会降低其活性。第三,由于底物或者产物不能扩散到生物催化剂内,在有机相中不同种类的催化作用将会降低。这样的话,仅仅位于生物催化剂表面的脂肪酶分子才会有活性。

3 结论

本文采用有机溶剂预培养的筛选方法筛选到耐有机溶剂的产脂肪酶的酵母菌耶罗威亚酵母属 (*Yarrowia*)。研究表明在各种来源的脂肪酶中,以细菌假单胞菌菌株所产的脂肪酶在有机相中催化反应的类型最多、反应活性及稳定性最高,应用

此酵母菌产的脂肪酶的报道则很少,而且大多数用于有机相催化反应的脂肪酶都是固定化脂肪酶。本研究表明:该菌在摇瓶条件下能利用酵母膏做氮源,油脂可作为脂肪酶形成的碳源和诱导物。摇瓶产酶的最适产酶条件为 27℃,初始 pH 6.5,发酵周期短,该酶在 70℃ 以下, pH 7.5 时最稳定。并且该粗酶粉能在叔戊醇溶剂中催化合成 L-抗坏血酸脂肪酯。

参考文献

- [1] 宋欣,曲音波. 微生物学通报, 1999, 26 (4): 296 ~ 299.
- [2] 杨利,谭红,黄德音. 精细化工, 1995, 12 (3): 33 ~ 36.
- [3] Hun C J, Rahman R N Z A, Salleh A B, et al. Biochemical Engineering Journal, 2003, 15: 147 ~ 151.
- [4] Ye P, Xu Z K, Wang Z G, et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2005, 32: 115 ~ 121.
- [5] 汤鲁宏,张浩,孙云飞. 食品工业科技, 1999, 5: 57 ~ 58.
- [6] Pencreach G, Baratti J C. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28: 473 ~ 479.
- [7] Lima V M G, Krieger N, Mitchell D A, et al. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18: 65 ~ 71.
- [8] Shapira-Levinger M, Fishman A. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 9: 251 ~ 257.
- [9] Ulbert O, Fráter T, Bélafi-Bakó K, et al. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, 31: 39 ~ 45.
- [10] Destain J, Roblain D, Thonart P. Biotechnology Letters, 1997, 19 (2): 105 ~ 107.

• 稿件规范化与标准化 •

计量单位

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: 用量和单位的比值表示数值, 即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开, 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: 20cm × 0.3cm, 不能写成 20 × 0.3cm; 3℃ ~ 5℃ 不可写成 3 ~ 5℃; 3% ~ 6% 不可写成 3 ~ 6% 等。