

耐受有机溶剂洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶酶学性质

吴继光^{1,2,3△} 舒正玉^{1,2,3△*} 程蓝骅^{1,2,3} 江欢^{1,2,3} 祝昌飞^{1,2,3} 黄建忠^{1,2,3*}

(1. 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心 福建 福州 350108)

(2. 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350108)

(3. 福建省现代发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

摘要: 一株对多种有机溶剂具有良好耐受能力的产脂肪酶菌株 ZYB002 经分子鉴定为洋葱伯克霍尔德菌。其产生的细胞结合脂肪酶最适温度为 65°C, 最适 pH 为 8.0, 在低于 70°C 和 pH 3–8.5 的范围内, 全细胞脂肪酶保持稳定。Ca²⁺、K⁺、Na⁺和 NO₃⁻等离子对脂肪酶活性有激活作用, 而 Zn²⁺有抑制效应。全细胞脂肪酶对正丁醇有较强的耐受能力, 但曲拉通 X-100 对脂肪酶活性有强烈的抑制效应。洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶良好的碱稳定性、热稳定性和有机溶剂耐受性, 表明该全细胞脂肪酶具有重要的工业应用潜力。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌, 有机溶剂耐受性, 全细胞脂肪酶, 酶学性质

Properties of Whole-cell Lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002 with Organic Solvent Tolerance

WU Ji-Guang^{1,2,3△} SHU Zheng-Yu^{1,2,3△*} CHENG Lan-Xing^{1,2,3} JIANG Huan^{1,2,3}
ZHU Chang-Fei^{1,2,3} HUANG Jian-Zhong^{1,2,3*}

(1. Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(2. College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350108, China)

(3. Engineering Research Center of Fujian Modern Fermentation Technology, Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: The lipase-producing strain ZYB002 with broad-spectrum organic solvent-tolerance was identified as *Burkholderia cepacia* complex by the *recA* sequence. The optimal pH and temperature for lipolytic activity of the cell-bound lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002 was 8.0 and 65°C, respectively. It was stable at temperature up to 70°C and retained 79.2% of its original activity for 1 h. The lipase was highly stable in the pH range from 3.0 to 8.5 for 6 h. Ca²⁺, K⁺, Na⁺, NO₃⁻, etc. ions stimulated its lipolytic activity, whereas Zn²⁺ ions caused inhibition. The cell-bound lipase was also relatively stable in *n*-butanol at a final concentration of 50% (V/V) for 24 h. However, the lipase was strongly inhibited in triton X-100 at a final concentra-

基金项目: 国家 863 计划资助项目(No. 2007AA100703); 国家自然科学基金资助项目(No. 30870545); 福建省自然科学基金(杰青)资助项目(No. 2009J06013)

△ 第一作者与第二作者有相同贡献

* 通讯作者: Tel: 86-591-22868212; ✉ shuzhengyu@gmail.com (舒正玉), hjz@fjnu.edu.cn (黄建忠)

收稿日期: 2009-05-27; 接受日期: 2009-09-15

http://journals.im.ac.cn

tion of 10% (*V/V*). The cell-bound lipase with thermal resistance, alkaline resistance and organic solvent resistance showed its' great potential in various industrial application fields.

Keywords: *Burkholderia* sp., Organic solvent tolerance, Whole-cell lipase, Biochemical characterization

微生物脂肪酶是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解或合成的酶类。除了可以催化水解反应和酯化反应外,微生物脂肪酶还可以催化醇解、氨解、酸解、转酯和酯交换等多种反应。微生物脂肪酶催化的化学反应具有严格的化学选择性、立体选择性和位点选择性等优点,因此已广泛应用于精细化工、药物合成、生物柴油生产、造纸和皮革加工等诸多领域^[1]。

作为一种非水相酶,微生物脂肪酶催化的各种化学反应基本上都是在各种有机溶剂体系中完成的,因此筛选和开发具有有机溶剂耐受性的微生物脂肪酶,对于提高脂肪酶的催化效率,扩大脂肪酶的应用领域,具有积极意义^[2]。许多微生物在分泌胞外脂肪酶的同时,还能产生细胞结合脂肪酶,定位于细胞壁或者细胞膜的周质空间^[3]。开发细胞结合脂肪酶,利用全细胞作为催化剂,可以有效减少酶制剂生产过程中的纯化工作,降低生产成本;同时细胞结合脂肪酶由于受到细胞的保护作用,通常较自由脂肪酶具有更长的催化半衰期^[4-5]。利用细胞结合脂肪酶作为全细胞催化剂近年来受到了广泛的关注。

洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia* complex)脂肪酶具有良好的有机溶剂耐受性和优良的对映体拆分能力,是在有机合成领域应用最为广泛的脂肪酶酶种之一^[6-7]。洋葱伯克霍尔德菌细胞表面也结合有脂肪酶,利用其细胞结合脂肪酶及其立体选择性催化活性, Yu 等将 D(L)-乙酸孟酯选择性水解为 L-孟酯,转化率高达 50%,操作稳定周期长于 400 h^[8]。本试验室分离到一株耐受有机溶剂的产脂肪酶菌株,经分子鉴定为洋葱伯克霍尔德菌。本文研究了该菌株细胞结合脂肪酶的基本酶学性质,为该菌株细胞结合脂肪酶的应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

ZYB002 菌株为本试验室从油污土壤中分离并纯化保藏。橄榄油为市售化学纯,各种有机溶剂均为市售分析纯,各种生化试剂均购自大连 TaKaRa

公司。

1.2 ZYB002 菌株的有机溶剂耐受性检测

接入适量 ZYB002 菌株甘油管保藏菌液到 Luria-Bertani 液体培养基, 37°C 过夜培养。过夜培养物按体积浓度为 1% 的接种量重新转接 Luria-Bertani 液体培养基,并同时添加占总体积 10% 的各种有机溶剂到 LB 液体培养基中, 37°C 培养 1-2 d, 每组有机溶剂耐受性实验均设立对照(不接入种子菌体)。与对照组相比,培养液明显变浑浊作为生长的定性指标。

1.3 ZYB002 菌株的分子鉴定

ZYB002 菌株基因组 DNA 的提取方法参照 Mahenthiralingam 等^[9]。 *recA* 基因的 PCR 扩增参照 Payne 等^[10]。正向和反向引物分别为 5'-GAA(G)AAGCAGTTCGGCAA-3' 和 5'-GAGTCGATGACGATCAT-3'。PCR 扩增程序为 95°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 25 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* DH5 α , 阳性克隆交上海生物工程公司进行序列测定。

1.4 洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶的发酵生产及细胞处理

Luria-Bertani 液体培养基 37°C 过夜活化的洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 菌悬液按照 2% (*V/V*) 的接种量接种发酵培养基。发酵培养基组成成分(% , *W/V*) 为: 豆油 0.5, 豆粉 2.0, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, K_2HPO_4 0.2, 橄榄油乳化液 3.3 (*V/V*), 吐温 80 1 (*V/V*), pH 6.0, 玻璃珠 5 颗, 每瓶(250 mL)装液量 35 mL。30°C、250 r/min 培养 24 h。离心收集菌体,用玻璃珠和 0.9% 的生理盐水打散并洗涤上述菌体沉淀 2 次,然后重悬于 0.9% 的生理盐水中。在盐离子对全细胞脂肪酶活性的影响试验中,生理盐水替换为无菌蒸馏水。

1.5 脂肪酶活力测定

脂肪酶活力测定采用碱性滴定法^[11]。60°C、pH 8.0 的条件下,每毫升菌悬液每分钟催化橄榄油水解产生 1 μmol 游离脂肪酸,定义为 1 个脂肪酶活力单位(U)。

2 结论与讨论

2.1 ZYB002 菌株对不同有机溶剂的耐受能力

ZYB002 菌株在各种有机溶剂中的生长情况见表 1。ZYB002 菌株对苯、己烷及正庚烷均表现出良好的耐受性,但不耐受各类醇。同时,ZYB002 菌株对不同有机溶剂的耐受能力与该有机溶剂的极性(log*P* 值,表 1 括号内数值)大小并无直接的对应关系,这可能与微生物耐受有机溶剂机制的多样性及不同有机溶剂诱导耐受性相关基因表达的机制存在差异有关^[12]。ZYB002 菌株不能在各类醇中生长存在 2 种可能性:(1) 各种醇抑制了菌体生长,菌体处于休眠状态,未死亡;(2) 醇致使菌体死亡或裂解。各类醇对 ZYB002 菌株生长的影响机理还有待进一步深入研究。

2.2 ZYB002 菌株的分子鉴定

具有有机溶剂耐受性的洋葱假单胞菌 ZYB002 菌株 *recA* 基因序列聚类分析结果如图 1。ZYB002 菌株与洋葱伯克霍尔德菌群(*Burkholderia cepacia* complex)有较高的同源性,尤其是与该菌群的 I 型基因型亲缘关系较近,因此将该菌株命名为 *Burkholderia* sp. ZYB002。

2.3 温度对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性和稳定性的影响

在 30℃–75℃ 下分别测定全细胞脂肪酶悬液的活力,结果见图 2A,全细胞脂肪酶作用的最适温度为 65℃。将全细胞脂肪酶悬液在不同温度(50℃–75℃)下保温 1 h,然后测定残留脂肪酶活力,结果见图 2B。此全细胞脂肪酶在 70℃ 以下较稳定,超过此温度,脂肪酶活性急剧下降。70℃ 下处理 1 h,残留脂肪酶活力仍高达 79.2%;但 75℃ 下处理 1 h,残留脂肪酶活力仅为 44.4%。洋葱伯克霍尔德菌全细胞脂肪酶的温度稳定性明显高于胞外脂肪酶的温度稳定性。Pencreac'h 报道的洋葱伯克霍尔德菌胞外脂肪酶在 70℃ 时的半衰期仅为 12 min^[6]。

2.4 pH 对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性和稳定性的影响

在 pH 2–10 的缓冲溶液中分别测定全细胞脂肪酶悬液的酶活力,结果见图 3A,全细胞脂肪酶作用的最适 pH 为 8.0。在不同 pH 条件下,室温处理全细胞脂肪酶悬液 6 h,然后测定残留脂肪酶活力,结果见图 3B。在 pH 8.5 的情况下处理 6 h 后,残余脂肪酶活力达 95%,说明洋葱伯克霍尔德菌全

| 表 1 ZYB002 菌株对不同有机溶剂的耐受能力 Table 1 The tolerance of ZYB002 strain to organic solvents | | | | | | |
|---|---------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 菌株 Strain | 甲醇 Methanol (-0.82) | 正戊醇 Pentanol (1.3) | 苯 Benzene (2.0) | 辛醇 Octanol (2.9) | 己烷 Hexane (3.5) | 正庚烷 Heptane (4.0) |
| ZYB002 | - | - | + | - | + | + |

注: 括号内的数字为该有机溶剂对应的 log*P* 值。
Note: The number in the bracket denotes the log*P* value of the organic solvent.

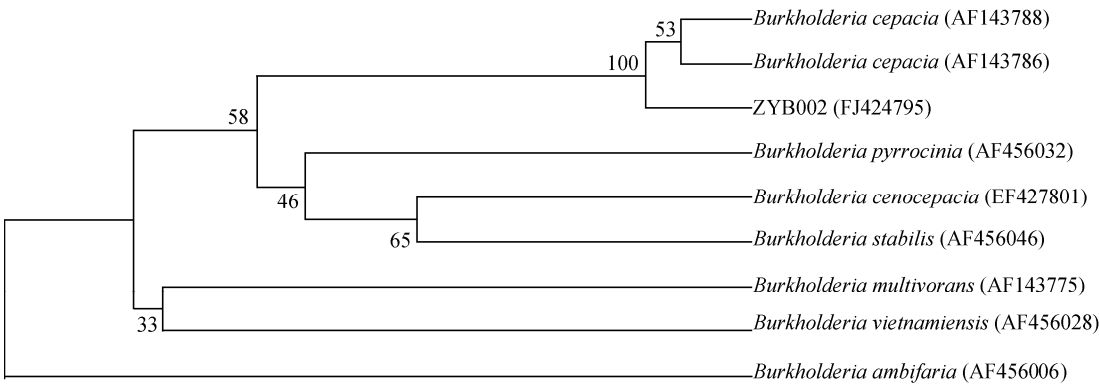


图 1 ZYB002 菌株 *recA* 基因序列聚类分析结果

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the ZYB002 strain using the *recA* sequence

注: 括号内数字为 GenBank 登录号; 分支点数字为 bootstrap 的支持率。
Note: The number in the bracket denotes the GenBank accession number and the number at every node denotes the value of bootstrap support.

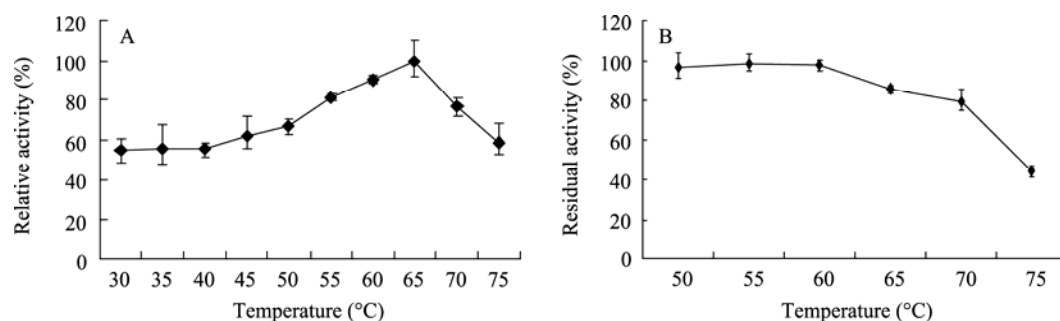


图2 温度对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性(A)和稳定性(B)的影响

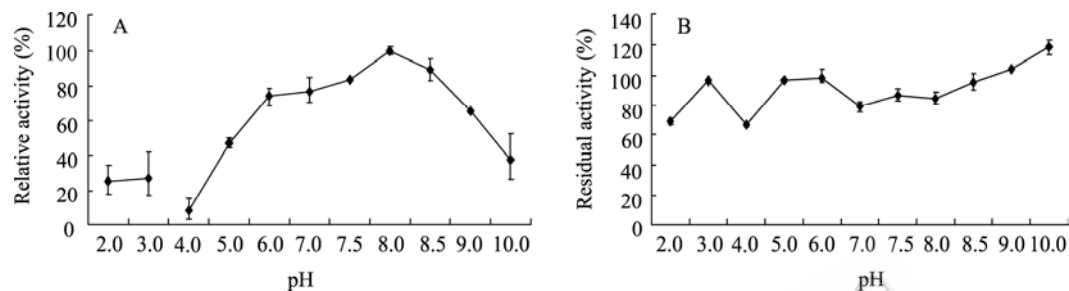
Fig. 2 Effect of temperature on activity (A) and stability (B) of the whole-cell lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002

图3 pH对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性(A)和稳定性(B)的影响

Fig. 3 Effect of pH on activity (A) and stability (B) of the whole-cell lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002

细胞脂肪酶具有较好的碱稳定性。pH 超过 9.0 的缓冲溶液处理细胞悬液 6 h 后, 强碱致使细胞裂解, 原始的细胞悬液逐步转变为粘稠的糊状物, 胞内脂肪酶释放, 导致测定的残留脂肪酶活力超过 100%。

2.5 不同盐离子对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性的影响

向全细胞脂肪酶悬液中分别加入不同的盐离子, 使其终浓度为 2 mmol/L, 同时以不加盐离子的全细胞脂肪酶悬液作为对照, 测定脂肪酶的活性, 结果如图 4 所示。 Ca^{2+} 、 K^{+} 、 Na^{+} 和 NO_3^{-} 等表现为激活效应, Zn^{2+} 表现为轻微的抑制效应。

2.6 洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶对不同有机溶剂的耐受能力

将各种有机溶剂与全细胞脂肪酶悬液按照 50% (V/V) 的比例混匀(吐温 80 和曲拉通 X-100 的浓度为 10%), 25°C 下处理 24 h 后测定脂肪酶残留的酶活力, 结果如图 5 所示。全细胞脂肪酶对正丁醇的耐受能力最强, 对曲拉通 X-100 的耐受能力最差。全细胞对有机溶剂的耐受能力与全细胞脂肪酶对有机溶剂的耐受能力是两个不同的概念和机制(如正丁醇对细胞生长的影响和对全细胞脂肪酶稳定性的影响)。细胞对有机溶剂的耐受能力与细胞膜表面的外排泵(Efflux pumps)相关, 而全细胞脂肪酶对有机

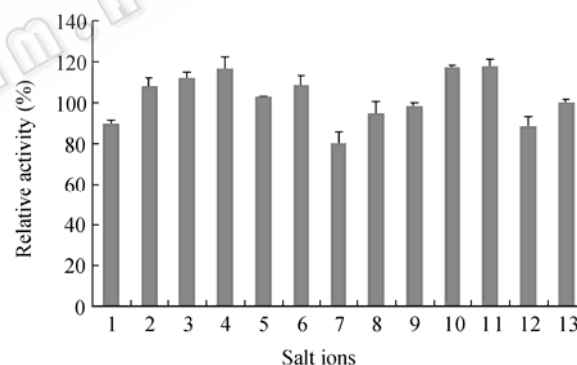


图4 不同盐离子对洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶活性的影响

Fig. 4 Effect of salt ions on activity of the whole-cell lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002

Note: 1: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2: K_2SO_4 ; 3: Na_2SO_4 ; 4: CaCl_2 ; 5: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 7: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 8: NaCl ; 9: Na_2CO_3 ; 10: NaNO_3 ; 11: $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 12: $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 13: None.

溶剂的耐受能力与酶分子自身的结构有关。

3 结语

利用细胞结合脂肪酶作为催化剂, 在酶制剂自身的分离纯化、酶制剂的稳定性及产物与酶制剂的分离等方面, 较胞外脂肪酶具有很大的优越性。通过优化洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶的发酵培养基, 可以有效提高细胞结合脂肪酶的发酵

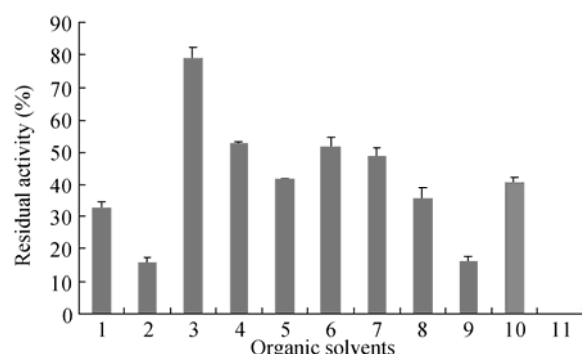


图5 洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶对不同有机溶剂的耐受能力

Fig. 5 Effect of organic solvents on stability of the whole-cell lipase from *Burkholderia* sp. ZYB002

Note: 1: Methanol; 2: Ethanol; 3: *n*-butanol; 4: *n*-pentanol; 5: *n*-octanol; 6: *n*-Heptane; 7: Benzene; 8: Toluene; 9: Acetone; 10: Tween 80; 11: Triton X-100.

水平。初步优化洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶的发酵工艺后,细胞结合脂肪酶水解橄榄油的酯解活力接近于 ZYB002 菌株胞外脂肪酶的活力,达 22.84 U/mL(实验室未发表数据)。同时, ZYB002 全细胞脂肪酶在酯合成反应中,也表现出较高的工业应用潜力(试验室初步数据)。洋葱伯克霍尔德菌 ZYB002 全细胞脂肪酶良好的碱稳定性、热稳定性和有机溶剂耐受性,表明其具有重要的工业应用潜力。利用蛋白质工程技术优化脂肪酶蛋白的催化性质,通过细胞表面展示技术,将优化后的脂肪酶蛋白展示于有机溶剂耐受性细菌表面,将进一步改良和提高全细胞脂肪酶的催化性能,推动全细胞脂肪酶催化剂在工业生产中的大规模应用。

参考文献

[1] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **39**(2): 235–251.

- [2] Rahman RN, Baharum SN, Basri M, *et al.* High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*, 2005, **341**(2): 267–274.
- [3] El Abbadi N, Druet D, Comeau LC. Immunocytochemical identification and localization of lipase in cells of the mycelium of *Penicillium cyclopium* variety. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, **42**(6): 923–930.
- [4] Ishige T, Honda K, Shimizu S. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005, **9**(2): 174–180.
- [5] De Bont JAM. Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. *Trends in Biotechnology*, 1998, **16**(12): 493–499.
- [6] Pencreac'h G, Leullier M, Baratti JC. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997, **56**(2): 181–189.
- [7] Tomić S, Ramek M. Quantum mechanical study of *Burkholderia cepacia* lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2006, **38**(3/6): 139–147.
- [8] Yu LJ, Xu Y, Wang XQ, *et al.* Highly enantioselective hydrolysis of DL-menthyl acetate to L-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, **47**(3/4): 149–154.
- [9] Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, *et al.* Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, **34**(5): 1129–1135.
- [10] Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, *et al.* Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, **71**(7): 3917–3927.
- [11] Saxena RK, Davidson WS, Sheoran A, *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochemistry*, 2003, **39**(2): 239–247.
- [12] Isken S, de Bont JA. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 1998, **2**(3): 229–238.

编辑部公告

关于《微生物学通报》英文刊名变更

《微生物学通报》目前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。

《微生物学通报》编辑部

2009-12-25