

高产脂肪酶菌株的筛选鉴定及酶学、转酯特性*

马抒晗 张玮佳 吴茜 姜腾飞 乔代蓉 曹毅**

四川大学生命科学学院微生物与代谢工程四川省重点实验室 成都 610065

摘要 从自然环境中筛选水解酶活高且酶学、转酯特性优良的产脂肪酶菌株,对脂肪酶工业化发酵生产及生物柴油制备的研究具有重要意义.采用罗丹明B平板初筛和摇瓶发酵复筛法,从70份含油脂丰富的样品中筛选产脂肪酶酶活较高的菌株进行16S rRNA鉴定,研究其酶学性质;用大孔树脂固定酶,在无溶剂体系中催化橄榄油制备生物柴油,研究其转酯特性.结果筛选到一株高产脂肪酶的菌株WZ10-3,通过p-NPP法测得其初始酶活为78.68 U/mL,经16S rRNA鉴定属于伯克霍尔德里菌(*Burkholderia* sp.),与*B. stabilis*同源性达到99%.该菌在发酵48 h时达到产酶高峰,所产脂肪酶的最适作用温度为50 °C,最适作用pH为7.0,70 °C下的半衰期可达1 h,pH为7-9时稳定性良好.以大孔树脂NKA-9和HPD600为载体制备的2种固定化脂肪酶,催化橄榄油生产生物柴油的转酯率均可达到97%.综合表明,菌株WZ10-3脂肪酶的初始水解酶活高于大多数野生脂肪酶,热稳定性好且转酯特性优良,有很好的后续研究价值.图7表3参25

关键词 脂肪酶;菌株筛选与鉴定;酶学性质;转酯;伯克霍尔德里菌;生物柴油

CLC Q936:Q556

Lipase-producing strain: isolation, identification, enzymology and transesterification*

MA Shuhan, ZHANG Weijia, WU Qian, JIANG Tengfei, QIAO Dairong & CAO Yi**

Microbiology and Metabolic Engineering Key Laboratory of Sichuan Province, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract For a better understanding of lipase industrial fermentation and biodiesel production, this study screened from natural environment lipase producing strains with high hydrolysis activity, stable enzymatic properties and excellent transesterification characteristics. The high lipase activity producing strain was isolated from 70 rich oil samples by Rhodamine B screening plates and shake flask fermentation, and was identified through 16S rRNA sequence. After studying of enzymatic properties, the lipase was immobilized on the macroporous resins NKA-9 and HPD600. The transesterification characteristics were studied by producing biodiesel from olive oil catalyzed by immobilized lipases in solvent-free system. The high lipase activity producing strain WZ10-3 was measured by p-NPP method to have an initial enzyme activity of 78.68 U/mL. The 16SrRNA sequence identified the strain as *Burkholderia* sp., of 99% homology with *B. stabilis*. Its lipase production reached a peak at 48 h of fermentation with the optimum reaction temperature of 50 °C and the optimum pH of 7.0. The lipase had a half-life of 1 h under 70 °C, and was stable under pH 7-9. The preparing biodiesel by lipases immobilized on the macroporous resins NKA-9 and HPD600 indicated that both immobilized lipases had 97% transesterification rate. The initial lipase activity of strain WZ10-3 is much higher than most other wild strains. Its good thermal stability and excellent transesterification characteristics prove the follow-up research value of the strain WZ10-3.

Keywords lipase; strain isolation and identification; enzymology; transesterification; *Burkholderia*; biodiesel

脂肪酶(EC3.1.1.3,又称三酰基甘油水解酶)是水解酶

中重要的一类,能在油水界面催化甘油三酯生成甘油及脂肪酸^[1].因其在非水相条件下催化反应可逆,现多被用于催化醇解、酯化和酯交换反应^[2].脂肪酶广泛存在于动、植物及微生物中,因微生物脂肪酶种类繁多,其中优秀菌株所产的脂肪酶可具有耐高温、耐有机溶剂等性状,比动、植物脂肪酶更具有潜力和优势^[3-4].此外,脂肪酶也是一类重要的工业酶,其高效的水解和转酯特性在多肽合成、制药、洗涤剂、饲料、食品等行业有广泛应用,其中利用酶促转酯反应合成生物柴油更是得到了国内外的积极关注,原因在于生物柴油可再生,对环境友好,且利用脂肪酶制备生物柴油的反应条件温和,产物易于分离,具有深远的经济和社会效益.

收稿日期 Received: 2014-01-15 接受日期 Accepted: 2014-04-11

*“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD14B05、2013BAD10B01、2014BAD02B02)、国家自然科学基金项目(31171447)和四川省科技厅项目(2014GZX0005、2013HH0007、2013GZX0161-3、2013GZ0058、2013JCPT003)资助 Supported by the Sci-tech Pillar Project of the Twelfth Five-year Plan of China (2011BAD14B05, 2013BAD10B01, 2014BAD02B02), the National Natural Science Foundation of China (31171447), and the Project of the Science and Technology Department of Sichuan Province (2014GZX0005, 2013HH0007, 2013GZX0161-3, 2013GZ0058, 2013JCPT003)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: caoyi_01@163.com)

不同种属的微生物所产的脂肪酶具有不同的催化特性,目前已报道的野生脂肪酶产生菌普遍产酶能力不高,初始水解酶活多在20 U/mL以下,且所产脂肪酶的酶学性质不稳定,不能良好地适用于各类工业生产,只有部分假丝酵母属(*Candida*)^[5]、根霉属(*Rhizopus*)^[6]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[7]和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)^[8]的菌株被广泛地应用和研究^[5-8]。此外,脂肪酶价格昂贵,在制备生物柴油的过程中损耗大也是工业化生产中常面临的问题,虽然目前可通过将脂肪酶进行固定化来提高酶的重复利用率以降低生产成本,但也普遍存在固定化脂肪酶的载体选择不易且转酯效率不高的情况。因此,本研究拟从自然环境中筛选一株性状优良的脂肪酶产生菌,探讨其所产脂肪酶的水解酶活、酶学特性及用不同载体固定化后的转酯活性,为后续的大规模发酵生产条件优化及生物柴油制备提供研究材料。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

样品分别采集于广西热带雨林、西双版纳、华南植物园、观音梁、峨眉山、成都锦江区各菜市场等地区长期受油污覆盖或营养丰富的土壤及水样,共62份土样、8份水样。

1.2 培养基

1.2.1 富集培养基 酵母膏0.2 g, NaCl 0.5 g, Na₂HPO₄ 3.5 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, 橄榄油10 mL, 用蒸馏水定容至1 000 mL, 121 °C灭菌20 min。

1.2.2 初筛罗丹明B培养基 选择以橄榄油为唯一碳源、罗丹明B为指示剂的培养基进行初筛:(NH₄)₂SO₄ 0.5 g, NaCl 4 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.4 g, 琼脂粉15 g, 橄榄油乳化液125 mL (4% PVA:橄榄油=3:1, 超声乳化), 用蒸馏水定容至1 000 mL, 121 °C灭菌20 min后, 待温度降至60 °C时加入1 mL罗丹明B (10 mg/mL) 溶液, 混匀后倒平板。

1.2.3 初始发酵培养基 蔗糖0.5 g, 蛋白胨2 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, 1 mL橄榄油, 用蒸馏水定容至100 mL, 自然pH, 115 °C灭菌15 min。

1.3 试剂及溶液配制

常用试剂均为国产分析纯;p-NPP购于美国sigma公司;限制性内切酶、EX-Taq聚合酶、RNA酶及TA克隆试剂盒购于TaKaRa生物工程公司;胶回收试剂盒购于TIANGEN生物公司;转酯用甲醇为气相色谱纯;大孔树脂HPD600、NKA-9为沧州宝恩吸附材料科技有限公司惠赠;转酯用工业脂肪酶LS-20购于北京凯泰新世纪生物技术有限公司。

1.4 主要仪器设备

高速离心机、恒温培养箱、摇床、紫外分光光度计、显微摄像仪、超声破碎仪、PCR仪、气相色谱仪等。

1.5 实验方法

1.5.1 初筛 称取1 g土样(或取1 mL水样), 悬于10 mL无菌蒸馏水中, 漩涡振荡。取3 mL土壤悬液加至30 mL富集培养基中, 30 °C、160 r/min振荡培养, 2 d后取1 mL菌液用无菌蒸馏水梯度稀释, 分别取10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶三个梯度的菌液涂布初筛罗丹明B平板, 30 °C恒温培养3-5 d, 观察菌落生长情况和生成的变色圈大小。

1.5.2 复筛 挑取能在初筛培养基上生长且有变色圈的菌落进行划线分离, 纯化后的菌株转接入LB或种子培养基中培养, 再以1%的接种量接入初始发酵培养基, 30 °C、160 r/min, 细菌培养48 h、真菌培养96 h后, 发酵液12 000 r/min离心10 min, 测定发酵上清中的脂肪酶酶活。

1.5.3 脂肪酶酶活测定 依据文献[4, 9]中的p-NPP(对硝基苯棕榈酸酯)分光光度比色法, 稍做改进测定初始水解酶活, 其中使用pH为7的磷酸钠缓冲液, 并加入1%的TritonX-100及阿拉伯树胶, 最后用0.05% SDS终止反应。一个脂肪酶活力单位(U)为40 °C、pH为7时, 每分钟分解底物p-NPP产生1 μmol p-NP(对硝基苯酚)所需的酶量, 以U/mL表示;而固定化脂肪酶的酶活定义为1 g固定化脂肪酶在40 °C、pH为7时, 每分钟分解底物p-NPP产生的1 μmol的p-NP量。

1.5.4 生长及产酶曲线测定 将活化好的菌液按1%的接种量分别接种于200 mL的LB及初始发酵培养基中, 30 °C、160 r/min下摇床培养, 每4 h取样一次, 在波长600 nm处测定吸光值绘制生产曲线, 发酵液上清测定脂肪酶酶活后绘制产酶曲线。

1.5.5 产脂肪酶菌株的鉴定 对筛选到的菌株进行形态学、显微镜观察后, 依照CTAB法^[10]提取细菌总DNA, 用通用引物27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'、1541R; 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'进行扩增, 胶回收后进行T-A连接及转化大肠杆菌, 对阳性克隆进行质粒提取及双酶切验证, 测序并对序列进行BLAST比对分析。

1.5.6 最适反应温度及热稳定性测定 其他测定条件不变, 在4-70 °C下测定酶活, 以测得的最高酶活为100%, 计算各温度下的相对酶活;将酶液置于各温度下进行保温, 每0.5 h测定一次酶活, 以未保温处理的酶液酶活为100%, 计算相对酶活。

1.5.7 最适反应pH及pH稳定性测定 由于p-NPP分光光度比色法受pH值影响较大, 故采用橄榄油滴定法^[11], 在缓冲液pH为4-11时测定酶活;将酶液置于不同pH下的缓冲液中40 °C保温24 h测定酶活, 以未处理的酶液酶活为100%, 计算相对酶活。

1.5.8 载体处理 大孔树脂用95%的乙醇浸泡24 h, 三级水反复冲洗至无酒精味后抽滤, 5% HCL浸泡2 h, 洗至中性, 再5% NaOH浸泡2 h, 洗至中性后浸泡于pH为7的磷酸钠缓冲液中备用。

1.5.9 脂肪酶固定 采用考马斯亮蓝法测定发酵液上清的蛋白含量, 将酶蛋白与载体以18 mg/g的比例混合于小三角瓶中, 于30 °C、160 r/min下吸附1 h, 测定上清中蛋白残量, 抽滤、用缓冲液冲洗后得到固定化酶, 4 °C下干燥并保存。其中, 载体固定的酶蛋白量=固定前发酵液上清酶蛋白总含量-固定后发酵液上清蛋白残量;固定吸附率=载体固定的酶蛋白量/固定前发酵液上清中酶蛋白总含量×100%;固定化酶蛋白载量=载体固定的酶蛋白量/载体质量;游离酶比酶活=游离酶酶活/1 mL发酵液中酶蛋白量;固定化酶比酶活=固定化酶酶活/1 g固定化酶中蛋白载量;酶活回收率=固定化酶比酶活/固定前游离酶比酶活×100%。

1.5.10 转酯率测定 采用无溶剂转酯体系, 将10 mL橄榄油, 5 mL H₂O, 1.66 mL甲醇与3 g固定化脂肪酶混合, 30 °C、160 r/min反应4 h^[12], 取1 mL反应液10 000 r/min离心5 min, 上

清用正己烷稀释150倍后进行气相色谱实验,以生成的脂肪酸甲酯比例计算转酯率。

2 结果与分析

2.1 产脂肪酶菌株的筛选

从各类样品及部分实验室菌种中分离筛选出54株能在初筛培养基中生长、有罗丹明B反应的细菌及真菌,分别接入初始发酵培养基中发酵复筛。表1为部分筛选菌株的初始酶活情况,可以明显地发现大部分初筛菌株所产脂肪酶酶活很低,均小于10 U/mL,部分甚至小于1 U/mL,而从峨眉山土壤样品中分离出的菌株WZ10-3的初始酶活可达到78.68 U/mL,远高于实验其他菌株,有很好的研究价值,因此选择菌株WZ10-3作为后续实验的研究对象,观察菌株WZ10-3在罗丹明B筛选平板生成的水解圈(图1)。

表1 部分筛选菌株初始酶活情况

Table 1 Strains for initial activity screening

菌株编号 Strain No.	酶活 Activity (1/U mL ⁻¹)	菌株编号 Strain No.	酶活 Activity (1/U mL ⁻¹)
100158	0.31	YB-3-2	3.5
300020	0.12	SK-2-1	2.45
300134	0.14	TL-1-1	1.05
X2-1	2.1	TL-1-2	2.1
X2-4	2.8	TL-1-6	1.05
S2-1	1.7	TL-1-8	2.63
S2-2	2.5	ZWY 1-2	6.56
N3	0.13	WZ2-1	0.29
X11	0.09	WZ4-5	0.21
LJ-3-1	0.17	WZ8-1	0.23
YB-3-1-2	3.38	WZ10-3	78.68



图1 菌株WZ10-3在罗丹明B筛选平板上生成的水解圈。

Fig. 1 Hydrolysis circle of Strain WZ10-3 on Rhodamine B screening flat.

2.2 高产脂肪酶菌株WZ10-3的鉴定

2.2.1 形态学观察 将菌株WZ10-3划线接种于LB固体培养基上,30℃下培养24 h,观察菌落生长情况,发现菌落较小且呈圆形,浅黄色,边缘整齐,表面光滑,不透明。进一步对WZ10-3进行革兰氏染色观察,电子显微镜下观察发现菌株为革兰氏阴性细菌,呈短杆状(图2)。



图2 菌株WZ10-3的菌落形态及革兰氏染色观察。

Fig. 2 Colony morphology and Gram staining of Strain WZ10-3.

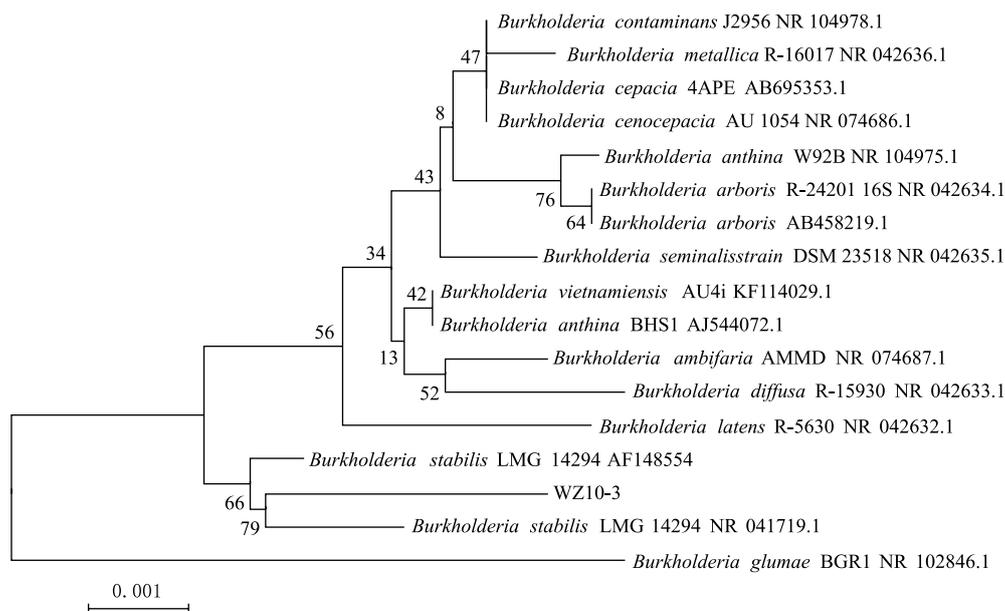


图3 WZ10-3的16SrRNA系统发育树。

Fig. 3 Phylogenetic tree of Strain WZ10-3 based on 16S rRNA sequence.

2.2.2 分子生物学鉴定 对菌株WZ10-3进行16SrRNA分子鉴定,采用通用引物进行PCR扩增后,获得约1 500 bp的片断.将测序得到的序列提交至Genbank获得登陆号:KJ095116,通过BLAST与NCBI Genbank数据库中已报道序列进行同源性比对,结果显示菌株WZ10-3与伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia* sp.)亲缘关系最近,其中与*B. stabilis*同源性达到99%,构建系统发育树(图3).

2.3 菌株WZ10-3的生长曲线及产酶曲线测定

研究菌株WZ10-3生长与产脂肪酶的情况(图4),发现菌株在0-4 h处于生长停滞和适应期,在4-18 h处于对数生长期,20-50 h左右处于稳定期,而52 h后开始进入衰亡期,符合细菌的一般生长特性.而菌株在对数生长期及稳定期前期产脂肪酶较少,在稳定期中、后期逐渐进入产酶高峰期,并于48 h时达到产酶最高峰,52 h后因菌株进入衰亡期,菌体大量死亡,产酶能力也大幅下降.因此后续实验均选择在菌株生长24 h时接入发酵培养基,发酵48 h后测定脂肪酶酶活.

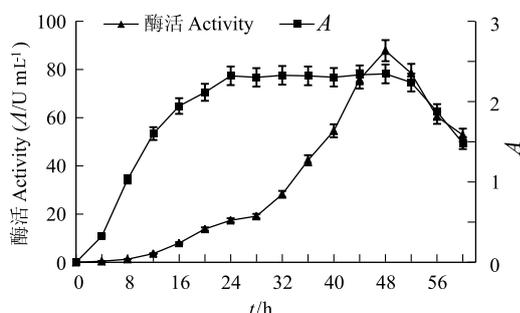


图4 菌株WZ10-3的生长曲线及产酶曲线.竖条表示标准偏差($N=5$).
Fig. 4 Growth curve and enzyme production curve of Strain WZ10-3. Bars indicate standard deviation ($N=5$).

2.4 菌株WZ10-3脂肪酶的基本酶学性质

2.4.1 最适反应温度及热稳定性 脂肪酶酶活从4 °C开始随反应温度的升高而增大,在40-50 °C的范围内较稳定,最适反应温度为50 °C,而当反应温度达到60-70 °C时,高温导致部分蛋白变性,酶活迅速下降,只有最高酶活的59.84%和27.86%(图5).

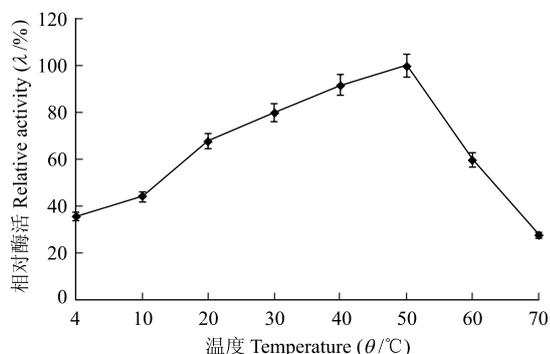


图5 菌株WZ10-3脂肪酶的最适反应温度.竖条表示标准偏差($N=5$).
Fig. 5 Optimum reaction temperature of Strain WZ10-3 lipase. Bars indicate standard deviation ($N=5$).

进一步研究该脂肪酶在各温度下的热稳定性,发现该酶在温度20 °C和40 °C下,稳定性良好,5 h后残余酶活均能保持在初始酶活的95%以上.而在4 °C、50 °C及60 °C下,2 h内酶活较为稳定,可保持在初始酶活的85%以上,随着时间的延长,残余酶活逐渐降低,5 h后为初始的50%-65%;而在70 °C下,脂肪酶相对不稳定,1 h后达到脂肪酶的半衰期,残余酶活为初始酶活的51%,而后继续迅速下降,2.5 h后为初始的10%左右(图6).

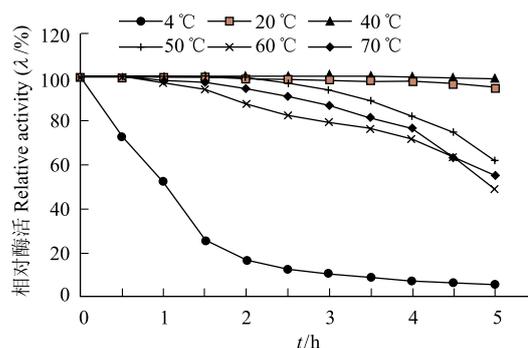


图6 菌株WZ10-3脂肪酶的热稳定性.
Fig. 6 Thermal stability of Strain WZ10-3 lipase.

2.4.2 最适反应pH及pH稳定性 由图7可知,该酶的最适反应pH为7,属于中性酶,偏酸或偏碱都不利于脂肪酶的作用,酶活下降明显,但在pH为7-8时酶活相对稳定,均可保持90%以上的酶活.而实验前期发现该酶的pH稳定性普遍较好,在不同pH值下处理5 h后,残余酶活均在初始的95%以上,故延长处理时间至24 h进一步研究.处理24 h后发现,该酶在pH为7-9时有良好的稳定性,24 h后依旧能保持95%以上的酶活,pH大于9后稳定性开始减弱,而在酸性条件下稳定性较差,随pH的减小酶活损失明显,当pH小于5时,24 h后的残余酶活不到初始酶活的50%.

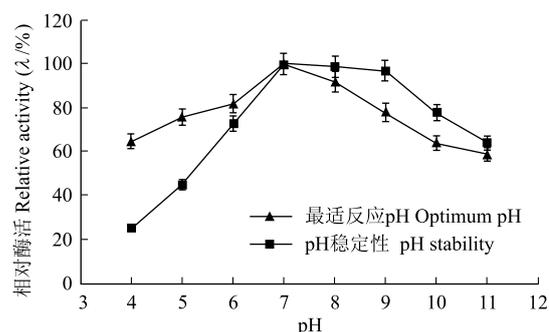


图7 菌株WZ10-3所产脂肪酶的最适反应pH及pH稳定性.竖条表示标准偏差($N=5$).
Fig. 7 Optimum reaction pH and pH stability of Strain WZ10-3 lipase. Bars indicate standard deviation ($N=5$).

2.5 菌株WZ10-3脂肪酶的转酯特性

2.5.1 菌株WZ10-3脂肪酶的固定化 对脂肪酶进行固定化可有助于提高酶的稳定性且便于在制备生物柴油过程中回收

再利用,因此实验首先将优化了部分发酵条件后获得的菌株WZ10-3脂肪酶进行固定,再进一步研究其转酯特性.固定前1 mL酶液含酶蛋白2.59 mg,酶活为234.8 U/mL,游离酶蛋白比酶活为90.65 U/mg.实验选择以大孔树脂NKA-9和HPD600为载体固定脂肪酶,1 h后两种载体的固定吸附率均达到了95%以上,比较2种固定化酶的酶活情况.

脂肪酶的固定化会因载体的介入减少了酶与底物的接触面积,或因大量酶聚集产生的位阻效应而伴随酶活的损失^[2],因此需要选择酶活损失较少的载体.由表2可知,由载体NKA-9及HPD600制得的2种固定化酶蛋白载量基本相同,而HPD600-WZ10-3的固定化酶酶活与比酶活较NKA-9-WZ10-3高,分别达到了974.85 U/g及56.47 U/mg.2种固定化酶均可表现出高于50%的酶活回收率,固定效果良好,因此将二者共同应用于后续的转酯实验,并与转酯用工业脂肪酶LS-20进行比较.

2.5.2 转酯性质研究 以橄榄油为底物在无溶剂体系中进行转酯反应,反应产物气相色谱分析如表3所示,结果表明3种脂肪酶均具有较高的转酯率,主要转酯产物相似,分别为棕榈酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯和亚油酸甲酯,其中以油酸甲酯得率最高,均超过50%,棕榈酸甲酯其次,而硬脂酸甲酯得率最低,产物成分与生物柴油要求相符,可用于生物柴油的制备^[13].而其中NKA-9-WZ10-3固定化酶及HPD600-WZ10-3固定化酶的转酯率分别为97.06%和97.17%,二者均表现出了优秀的转酯活性,远高于转酯用工业脂肪酶LS-20的83.43%,有良好的应用前景.

3 讨论

3.1 脂肪酶产生菌的筛选

目前已报道至少有65个属的微生物能产脂肪酶,但大多数野生菌株所产脂肪酶的酶活很低且热稳定性不佳,并不适用于工业应用.本研究从油脂富集的土壤中通过碳源限制的罗丹明B筛选平板分离筛选到了一株高产脂肪酶的野生菌株WZ10-3,其发酵后的脂肪酶初始酶活可达到78.68 U/mL,远高于大部分已报道的野生菌株,如Vrushali Dandavate等(2009)从土壤中筛选到的*B. multivorans* V2酶

活为6.477 U/mL^[14],Sasithorn Uttatree等(2010)筛选的耐甲苯的*Acinetobacter baylyi*酶活为(4.41 ± 0.02) U/mL^[15],而夏宇等(2013)筛选的白地霉在优化发酵条件前的酶活也仅为10.79 U/mL^[16].此外,还可通过优化发酵条件进一步提高菌株WZ10-3的酶活,后续实验也已验证其优化后的酶活可达到280 U/mL左右.

另一方面,平板法筛选脂肪酶产生菌,普遍是依据菌株在添加了酸碱指示剂的含油脂平板上生成的水解圈大小来判定,但因其主要受pH调节显色,易受样品本身尤其是水样的pH影响.本研究中使用的罗丹明B主要因其能与菌株分解橄榄油产生的脂肪酸特异性结合,产酶菌落周围会生成玫瑰红色物质,且该物质在紫外灯下呈现橙黄色荧光圈,能有效地排除假阳性结果,是合适的筛选指示剂.此外,因脂肪酶分子大小不同,若培养基琼脂浓度过大,将不适用于大分子脂肪酶的扩散和作用^[17],因此实验在较低浓度的琼脂培养基中添加罗丹明B指示剂更利于脂肪酶产生菌的有效筛选.

3.2 脂肪酶产生菌的鉴定及其多样性

野生菌株WZ10-3经16S rRNA鉴定后属伯克霍尔德氏菌,该属菌种因普遍能产酶活较高且性状优良的脂肪酶,与假单胞属菌及假丝酵母属等逐渐成为了研究热点,有良好的应用前景.虽然菌株WZ10-3与*B. stabilis*同源性达到了99%,但因所属的洋葱伯克霍尔德氏菌复合型(*B. cepacia complex*, BCC)基因型复杂,目前已知的已超过17种且部分基因型具有致病性,而*B. stabilis*是第IV种,因此若要进行菌株的直接发酵生产,还需明确其基因型.而BCC各基因型间的16S rRNA序列具有98%-99%的相似性,普通实验不易将其进行区分鉴定,但近期研究发现其*recA*基因序列仅具有94%-95%的相似性,因此后续实验还可通过*recA*基因特异引物PCR检测法进一步确定菌株WZ10-3的基因型^[18].此外,因伯克霍尔德氏菌普遍具有抗生素抗性^[19],还可在筛选培养基中适当添加抗生素来特异性筛选伯克霍尔德氏菌这一优势产脂肪酶菌属.

3.3 菌株WZ10-3脂肪酶的基本酶学性质

微生物脂肪酶的最适作用温度因其菌株的来源不同有很大差异,可分为低温、中温和高温脂肪酶,真菌来源的脂肪酶一般为中、低温脂肪酶,而大多数细菌来源的脂肪酶则对温度的耐受性较好,多属中、高温脂肪酶,但也有细菌

表2 2种固定化脂肪酶的酶活比较

Table 2 Lipase activity comparison of two immobilized lipases

固定化脂肪酶类型 Immobilized lipase type	固定化酶蛋白载量 Lipase loading (w/mg g ⁻¹)	固定化酶酶活 Immobilized lipase activity (λ/U g ⁻¹)	固定化酶蛋白比酶活 Immobilized lipase specific activity (λ/U mg ⁻¹)	酶活回收率 Activity recovery (r/%)
NKA-9-WZ10-3	17.27	797.98	46.22	51.03
HPD600-WZ10-3	17.26	974.85	56.47	62.36

表3 转酯产物的气相色谱结果

Table 3 GC results of transesterification products

脂肪酶类型 Lipase type	棕榈酸甲酯 Hexadecanoic acid methyl ester (P/%)	硬脂酸甲酯 Octadecanoic acid methyl ester (P/%)	油酸甲酯 9-Octadecenoic acid methyl ester (P/%)	亚油酸甲酯 9,12-Octadecadienoic acid methyl ester (P/%)	其他脂肪酸甲酯 Other fatty acid methyl ester (P/%)	总含量 Total (P/%)
NKA-9-WZ10-3	28.19	1.63	55.87	11.37	0.00	97.06
HPD600-WZ10-3	24.66	2.90	56.25	10.22	1.07	97.17
LS-20	10.46	1.69	64.00	6.65	0.63	83.43

来源脂肪酶嗜低温的报道^[20]。菌株WZ10-3所产脂肪酶最适作用温度为50℃,属中温脂肪酶。而脂肪酶的热稳定性与其结构及所处的环境均有密切的关系,在本实验条件下,菌株WZ10-3脂肪酶的热稳定性较好,60℃下2h内基本能保持初始酶活,而70℃下的半衰期为1h,高于薛静等(2011)报道的黑曲霉(*Aspergillus niger*)在60℃下保温1.5h后残余酶活仅为初始的79.07%^[21]。此外细菌来源的脂肪酶pH适应性一般较广,但最作用pH一般为8-10,属于碱性脂肪酶的较多,而本研究所得的WZ10-3脂肪酶最适pH为7,为中性脂肪酶,且在pH为7-9时稳定性非常好,处理24h后均能基本保持初始酶活,但在酸性条件下稳定性欠佳。

今后还可通过紫外诱变、定点突变等方法进行脂肪酶的改造,进一步优化各项酶学性质、提高酶的有机耐受性等,如蔡少丽等(2013)就曾利用重叠延伸PCR方法对扩展青霉脂肪酶基因进行体外定点突变提高了其热稳定性,获得的突变酶在40℃温浴30min后残余酶活为初始的89%,比野生型脂肪酶PEL-GS提高了54%^[22]。

3.4 菌株WZ10-3脂肪酶的转酯特性

本研究通过制备菌株WZ10-3脂肪酶的固定化酶来研究其转酯特性,其转酯率除了主要与脂肪酶本身的催化性质有关外,载体的性质及转酯的反应条件也有一定影响。载体孔径过大则脂肪酶分子易脱落,孔径过小则易因大量酶分子堵塞通道,使酶无法与底物充分接触,导致酶活的大量损失。而实验所选用的2种大孔树脂价格便宜,孔径大小适中均在8-16nm之间,制得的固定化酶酶活回收率均高于50%,是较为合适的载体。

此外,目前转酯生成生物柴油的实验多以正己烷作为溶剂且普遍反应时间较长,而本实验则采用了近期研究热点的无溶剂转酯体系。Habib Horchani(2010)及Baron A.M等(2014)都证明了该体系的转酯反应能在试剂消耗小且反应时间短的情况下有效地进行^[23-24],后者的研究中利用固定化*B. cepacia* LTEB11转化蓖麻油来制备生物柴油,反应6h后的转酯率达到了90%。而本研究制得的2种固定化酶在反应4h后均可达到97%以上,优于上述脂肪酶,虽与张学林等(2013)在利用响应面法优化了水含量、酶添加量和醇油比等条件后的转酯率相似^[25],但本实验的反应时间更短,优于前者的12h。因此本研究表明,利用菌株WZ10-3脂肪酶制得的固定化酶具有良好的转酯活性和应用前景,后续还可进一步优化固定及转酯条件以提高固定化酶的酶活回收率、转酯率和重复利用率,使之更加适应工业生产。

参考文献 [References]

- 1 Cho SS, Park DJ, Simkhada JR, Hong JH, Sohng JK, Lee OH, Yoo JC. A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326 [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, **35** (1-2): 227-234
- 2 Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review [J]. *Biotechnol Adv*, 2010, **28** (5): 628-634
- 3 Defranceschi O, Anne C, Farion W, Felipe M, Coelho V, José V, Fernandes R, Maria L, Bellin M, André. Production of methyl oleate with a lipase from an endophytic yeast isolated from castor leaves [J]. *Biocatal*
- 4 Dheeman DS, Frias JM, Henehan G.T. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, **37** (1): 1-17
- 5 Kim BS, Hou CT. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea* [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2006, **29** (1): 59-64
- 6 Açikel Ü, Erşan M, Sağ AY. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar* [J]. *Food Bioprod Process*, 2010, **88** (1): 31-39
- 7 Ruchi G, Anshu G, Khare SK. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: production optimization by response surface methodology and application [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99** (11): 4796-4802
- 8 Kawakami K, Ueno M, Takei T, Oda Y, Ryo T. Application of a *Burkholderia cepacia* lipase-immobilized silica monolith micro-bioreactor to continuous-flow kinetic resolution for transesterification of (*R, S*)-1-phenylethanol [J]. *Process Biochem*, 2012, **47** (1): 147-150
- 9 Winkler UK. Glycogen hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens* [J]. *Bacteriol*, 1979, **138**: 663-701
- 10 Lucas T, Francois J, Bohuon P. Factors influencing mass transfer during immersion cold storage of apples in NaCl/sucrose solutions [J]. *Lebensm-Wissu-Technol*, 1999, **32**: 327-332
- 11 王艳华, 刘飞飞, 程仕伟. *Bacillus subtilis* CICC 20034产脂肪酶的培养条件研究[J]. 食品与药品, 2012, **14** (2): 84-87[Wang YH, Liu FF, Cheng SW. Study on culture condition for lipase-producing *Bacillus subtilis* CICC 20034 [J]. *Food Drug*, 2012, **14** (2): 84-87]
- 12 Liu CH, Huang CC, Wang YW, Lee DJ, Chang JS. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles [J]. *Appl Energy*, 2012, **100**: 41-46
- 13 Wyatt VT, Haas MJ. Production of fatty acid methyl esters via the in situ transesterification of soybean oil in carbon dioxide-expanded ethanol [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2009, **86** (10): 1009-1016
- 14 Dandavate V, Jinjala J, Keharia H, Madamwar D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis [J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100** (13): 3374-3381
- 15 Uttatree S, Winayanuwattikun P, Charoenpanich J. Isolation and characterization of a novel thermophilic-organic solvent stable lipase from *Acinetobacter baylyi* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, **162** (5): 1362-1376
- 16 夏宇, 周文, 邓学良, 伍金娥. 脂肪酶高产菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 中南林业科技大学学报, 2013, **33** (9): 116-120 [Xia Y, Zhou WH, Deng XL, Wu JE. Isolation of high lipase-producing strains and optimization of lipase producing conditions [J]. *J Central South Univ For Technol*, 2013, **33** (9): 116-120]
- 17 Sorokin DY, Jones BE. Improved method for direct screening of true lipase-producing microorganisms with particular emphasis on alkaline

- conditions [J]. *Microbiology*, 2009, **78** (1): 125-130
- 18 Shu Z, Lin R, Jiang H, Zhang Y, Wang M, Huang J. A rapid and efficient method for directed screening of lipase-producing *Burkholderia cepacia* complex strains with organic solvent tolerance from rhizosphere [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, **107** (6): 658-661
- 19 Mahenihiralingam E, Urban TA, Goldberg JB. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, **3** (2): 144-156
- 20 陈贵元, 魏云林. 低温脂肪酶的研究现状与应用前景[J]. 生物技术通报, 2006, **12**: 29-32 [Chen GY, Wei YL. The research status and application prospect of cold-adapted lipases [J]. *Biotechnol Bull*, 2006, **12**: 29-32]
- 21 薛静, 陶树兴, 田泽英, 苏蕊, 丛寅. 脂肪酶产生菌的筛选、产酶条件及酶特性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, **39** (15): 8826-8830 [Xue J, Tao SX, Tian ZY, Su R, Cong Y. Screen of lipase production strains and study on condition for lipase production and properties of lipase [J]. *J Anhui Agric.Sci*, 2011, **39** (15) : 8826-8830]
- 22 蔡少丽, 邹有土, 黄建忠, 林琳. 定点突变对扩展青霉脂肪酶热稳定性的改善[J]. 应用与环境生物学报, 2013, **19** (1): 43-47 [Cai SL, Zou YT, Huang JZ, Lin L. Improvement of thermostability of *Penicillium expansum* lipase by site-directed mutagenesis [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2013, **19** (1): 43-47]
- 23 Horchani H, Chaâbouni M, Gargouri Y, Sayari A. Solvent-free lipase-catalyzed synthesis of long-chain starch esters using microwave heating: Optimization by response surface methodology [J]. *Carbohydr Polym*, 2010, **79** (2): 466-474
- 24 Baron AM, Barouh N, Barea B, Villeneuve P, Mitchell DA, Krieger N. Transesterification of castor oil in a solvent-free medium using the lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11 immobilized on a hydrophobic support [J]. *Fuel*, 2014, **117**: 458-462
- 25 张学林, 唐湘华, 李俊俊, 宋拓, 慕跃林, 许波, 杨云娟, 黄遵锡. 低温脂肪酶酶促酯交换制备生物柴油[J]. 中国油脂, 2013, **38** (2): 66-68 [Zhang XL, Tang XH, Li JH, Song T, Mu YL, Xu B, Yang YJ, Huang ZX. Biodiesel production by low temperature lipase catalysed transesterification [J]. *China Oils Fats*, 2013, **38** (2): 66-68]