

# 重组脂肪酶X12-5的大规模发酵 及其酶学性质研究

王凤<sup>1,2</sup>, 唐湘华<sup>1,2,3,4</sup>, 李俊俊<sup>1,2,3,4</sup>, 许波<sup>1,2,3,4</sup>, 杨云娟<sup>1,2,3,4</sup>, 谢振荣<sup>1,2</sup>, 黄遵锡<sup>1,2,3,4,\*</sup>

(1. 云南师范大学生命科学学院, 云南昆明 650500;

2. 云南师范大学酶工程重点实验室, 云南昆明 650500;

3. 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南昆明 650500;

4. 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 云南昆明 650500)

**摘要:** 实验室保藏的一株产脂肪酶基因工程菌X12-5, 经过摇瓶发酵, 测得酶活力为65U/mL。为进一步提高酶活力, 应用于工业生产, 将其进行上罐(180L)发酵。大规模发酵后, 酶活高达220000U/g, 实现了脂肪酶的高效表达。对其酶学性质研究表明, 最适温度和pH分别为45℃和7.0; pH在4.0~7.0, 温度在50℃以下酶活相对稳定; Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>对酶活有明显促进作用。由该脂肪酶的酶学性质初步判断其在制革工业上具有潜在的应用价值。

**关键词:** 脂肪酶, 基因工程菌, 大规模发酵, 酶学性质

## Research of large-scale fermentation of Recombinant Lipase X12-5 and its characterization

WANG Feng<sup>1,2</sup>, TANG Xiang-hua<sup>1,2,3,4</sup>, LI Jun-jun<sup>1,2,3,4</sup>, XU Bo<sup>1,2,3,4</sup>, YANG Yun-juan<sup>1,2,3,4</sup>,  
XIE Zhen-rong<sup>1,2</sup>, HUANG Zun-xi<sup>1,2,3,4,\*</sup>

(1. Life Science School of Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;

2. The Key Lab of Enzyme Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;

3. Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy,  
Ministry of Education, Kunming 650500, China;

4. Key Lab of Yunnan Province for Biomass Energy and Environmental Biotechnology, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Though shaking fermentation, the enzyme activity of a laboratory preserved genetic engineered strain X12-5 which could produce lipase had reached up to 65U/mL. For the purpose of enhancing the enzyme activity which could help a lot in industrial production, the tank (180L) fermentation had been used. After the tank (180L) fermentation, mass fermentation, the enzyme activity of genetic engineering bacteria X12-5 had reached to 220000U/g which achieved efficient expression of lipase. From the study of its enzymatic characteristics, the lipase exhibited maximum activity at 45℃ and pH7.0, and it was stable below 50℃ while the pH was ranging from 4.0 to 7.0. The lipase's activity could be activated by Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. From preliminary judgment to the enzymatic characteristics, the conclusion we got is that the lipase has a potential value in applications of the leather industry.

**Key words:** lipase; genetically engineered microorganisms; large-scale fermentation; enzymatic characteristics

中图分类号: TS201.2+5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)13-0139-04

脂肪酶(triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3, 甘油三酯酯水解酶)是一类能催化长链脂肪酸甘油酯水解为甘油和长链脂肪酸(或者是此反应的逆反应)的生物催化剂, 其可在油水界面或水不溶性系统中催化酯交换、酸解、水解、胺解、转酯、醇解、酯化等化学反应, 具有立体选择性、化学选择性、底物专一性和

位点选择性等特点<sup>[1]</sup>。脂肪酶是水解酶中最重要的一类<sup>[2]</sup>, 在油脂加工、洗涤、食品加工、医药、化妆业、皮革加工、饲料、造纸、有机合成、精细化工以及生物能源等诸多领域有着广泛的应用<sup>[3]</sup>。酶制剂在制革中的应用由来已久, 历史上它主要用于软化和脱毛, 并且这方面已做过大量工作。Feigl讨论了酶在准备工段应用的可能性和局限性, Martigone等人阐述了酶在浸水、软化、脱毛、脱脂中的使用知识<sup>[4]</sup>。近年来, 制革工业中酶法脱脂得到了许多关注和实际应用, 被认为是一种绿色高效的脱脂方法<sup>[5-8]</sup>, 并且, 被广泛地应用于制革准备工段的各主要工序, 成为高档皮革生产过

收稿日期: 2011-12-08 \* 通讯联系人

作者简介: 王凤(1983-), 女, 在读硕士, 研究方向: 酶工程。

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2010GB2F300436); 云南省应用基础研究重点项目(2006C0004Z)。

程中不可缺少的材料。然而,酶的应用范围在某些生产工艺中因pH稳定性或热稳定性差而受到限制,易受产物抑制作用的影响,以及工艺要求的温度和pH不在酶反应的最适范围内等。本实验室保存的一株基因工程菌X12-5,反应活性强,酶活力高,经过大规模生产发酵,测得脂肪酶酶活在同行业中居于前列<sup>[9-10]</sup>。对其酶学性质研究发现:pH稳定性和热稳定性都很好,且初步判断其产物抑制性较小,具备制革工业上对脂肪酶的基本要求。本研究为后期该脂肪酶在制革上的应用提供了参考数据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

**菌株来源** 实验室保存的一株毕赤酵母表达的基因工程菌X12-5;YEPD培养基(质量浓度) 胰蛋白胨2.0%、酵母粉1.0%、葡萄糖2.0%、琼脂2.0%、加单蒸水至100mL,高压灭菌;FA培养基(质量浓度) 胰蛋白胨2.0%、酵母粉1.0%、甘油2mL、加单蒸水至78mL,高压灭菌,冷却到不烫手加10×YNB 10mL、50×生物素2mL、磷酸储备液10mL;FB(质量浓度) 胰蛋白胨2.0%、酵母粉1.0%、加单蒸水至76mL,高压灭菌,冷却到不烫手加甲醇2mL、10×YNB 10mL、50×生物素2mL、磷酸储备液10mL;聚乙烯醇 PVA, Sigma公司;橄榄油 分析纯,成都科龙化工试剂厂;其他试剂 均为分析纯和化学纯。

PL203型分析天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;CZD3型乳化机 上海氟鲁克流体机械制造有限公司;TDGC2-3型灭菌锅 天正集团有限公司;SW-CT-2FD型超净工作台 苏州净化设备有限公司;SGSP-02型生化培养箱 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌种的活化及培养** 将基因工程菌X12-5在YEPD培养基上活化2d后,先接种至FA培养基培养48h,5000r/min离心10min后将菌体转至FB培养基培养48h,进行摇瓶发酵,测酶活。再接种到FA培养基摇瓶发酵1d,进行上罐(180L)发酵。发酵过程中监测发酵液的各项指标,待酶活力不再增长时停止发酵。

#### 1.2.2 脂肪酶的酶活力测定方法

**1.2.2.1 脂肪酶活性测定** 参见施巧琴法<sup>[11]</sup>。取4个100mL三角瓶,每瓶加入5mL 0.025mol/L磷酸缓冲液和4mL的橄榄油乳化液,40℃水浴保温5min,然后在2个瓶中各加1mL离心上清酶液(10000r/min)。从加入酶液开始精确记时,继续保温15min后取出,立即加入95%的乙醇15mL终止酶的作用,再加入3滴酚酞指示剂,用0.05mol/L NaOH滴定溶液至呈粉红色。酶活取平均值。

**1.2.2.2 酶活力的定义和计算公式** 酶活力定义:在反应条件下,每分钟催化脂肪水解产生1 $\mu$ mol脂肪酸的脂肪酶量定义为1个脂肪酶国际单位, U。

酶活的计算:脂肪酶活力 $U=(V_1-V_2) \times 0.05 \times 1000 / 15$

式中: $V_1$ -待测溶液滴定值; $V_2$ -对照滴定值;0.05-标准NaOH摩尔量(mol/L);15-测酶活反应时间为15min。

### 1.2.3 重组脂肪酶粗酶学性质的研究

**1.2.3.1 温度对重组脂肪酶活力和稳定性的影响** 在30~70℃范围内,按标准方法每隔5℃测定一次酶活力,以最高酶活力为100%,每个温度三个平行,酶活取平均值。测定热稳定性时,将酶液在不同温度(20~70℃)下保温1h后立即冷却,按标准方法测定残余酶活力,以未保温酶液测得的酶活为100%。

**1.2.3.2 pH对重组脂肪酶活力和稳定性的影响** 将酶液加在不同pH(2.0~10.0)的缓冲液中,按标准方法测定酶活,以最高酶活力为100%。每个pH三个平行,酶活取其平均值。其中,pH2.0~8.0用柠檬酸缓冲液,8.0~9.0使用Tris-HCl缓冲液,9.0~10.0采用甘氨酸-NaOH缓冲液。测定pH稳定性时,酶液用不同pH(3.0~10.0)的缓冲液稀释10倍,在45℃水浴中保温1h后测定残余酶活,以未处理的酶液酶活为100%。

**1.2.3.3 金属离子对重组脂肪酶活力的影响** 向酶液中加入各种金属离子( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ),使其终浓度为10mmol/mL,测定其酶活力,以未处理的酶活力为100%。

**1.2.3.4 底物浓度对脂肪酶活力的影响** 配制不同浓度的底物(2.5%、5%、10%、15%、20%、22.5%),按照标准方法测定其酶活力。

**1.2.3.5 正交实验** 依据单因素实验结果,选取pH,底物浓度,温度, $Mg^{2+}$ 四个因子,进行四因素三水平实验。因素水平见表1。

表1 实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of experiment

水平	因素			
	A pH	B 底物浓度(%)	C 温度(℃)	D $Mg^{2+}$ (mmol/mL)
1	6.5	5	40	1
2	7.0	10	45	10
3	7.5	20	50	100

## 2 结果与分析

### 2.1 脂肪酶X12-5的大规模发酵

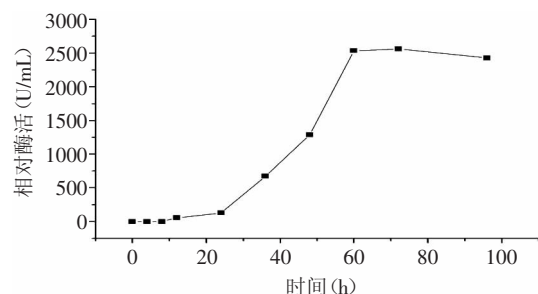


图1 发酵过程参数变化

Fig.1 Variation of fermentation parameter

摇瓶发酵X12-5,测得酶活力为65U/mL。将该菌株上罐发酵培养。发酵过程中,控制发酵液的温度、溶氧和pH,并监测其酶活力,见图1。使其温度在32℃左右,pH在4.3左右,溶氧在80mg  $O_2$ /mL左右。发酵60h时,酶活力达到最大,为2535U/mL,96h后酶活开始下降,停止发酵。说明该菌株产酶速度比较慢。将发酵液过滤浓缩处理后,按照固(淀粉和糊精按4:1混合)液比3:1的比例分四次向固体中加入浓缩酶液,每加一次1/4的浓缩酶液后,在50℃以下烘干,再加1/4的

浓缩酶液,同样在50℃下烘干,最后粉碎,制成固体酶粉。测得酶活力达到220000U/g,在同行业当中,目前居于前列,实现了高效表达。

## 2.2 重组脂肪酶粗酶学性质的研究

**2.2.1 温度对重组脂肪酶活力和稳定性的影响** 如图2所示,该脂肪酶的最适温度为45℃。在30~50℃之间酶活力基本保持在80%以上。温度大于45℃酶活下降,70℃又略有升起,有可能是高温使底物分解所致。由图3可见,在50℃以下该脂肪酶保温60min的酶活保持在80%~90%之间,稳定性较好。50℃酶活力开始下降,60℃以下酶活力迅速下降。70℃仍能维持在30%左右。

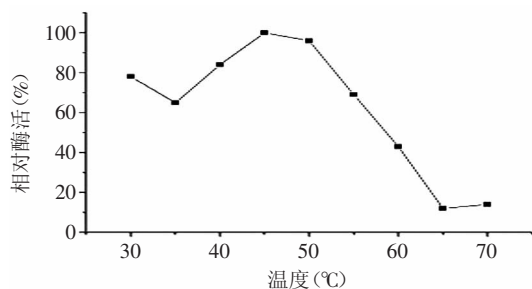


图2 酶的最适温度

Fig.2 Optimum temperature of the enzyme activity

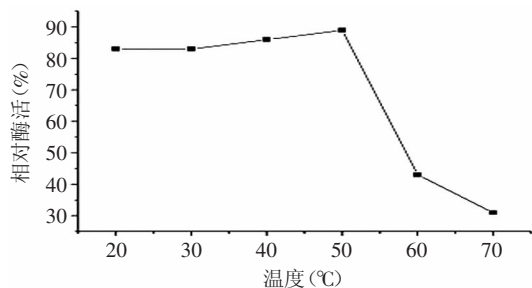


图3 酶的温度稳定性

Fig.3 The temperature stability of the enzyme activity

**2.2.2 pH对重组脂肪酶活力和稳定性的影响** 由图4可知,该脂肪酶的最适pH为7.0。其作用范围较广,pH2.0~10.0都有酶活。pH5.0~8.0酶活可维持在70%左右。在pH的稳定性实验中,如图5,将该脂肪酶在pH4.0~7.0的缓冲液中45℃水浴保温1h,酶活力可稳定在90%以上;pH大于7.0时,耐受1h酶活力开始下降,pH为10.0时,耐受1h酶活力还可达到40%左右。说明该脂肪酶的pH耐受性较好。

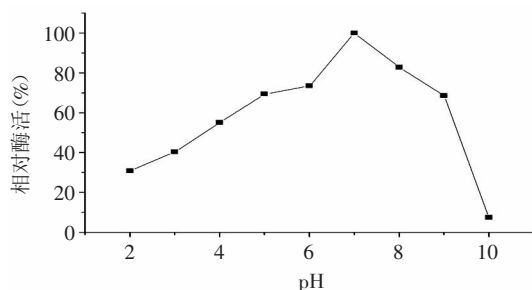


图4 pH对脂肪酶活力的影响

Fig.4 Effect of pH on activity to lipase

**2.2.3 金属离子对重组脂肪酶活力的影响** 由图6

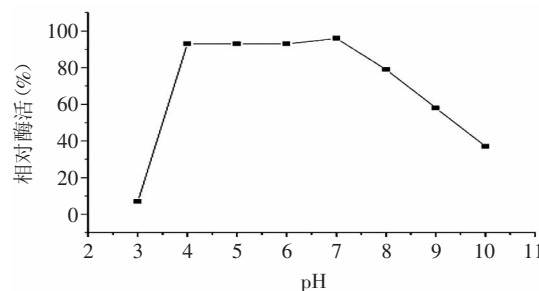


图5 pH对脂肪酶稳定性的影响

Fig.5 Effect of pH on lipase stability

可知Mg<sup>2+</sup>对脂肪酶酶活有明显的促进作用,可使酶活增加至180%。Mn<sup>2+</sup>和Ca<sup>2+</sup>分别使酶活增加到139.29%和128.57%。而Fe<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>对该脂肪酶有明显的抑制作用,分别使酶活降至28.57%和46.43%。Na<sup>+</sup>和K<sup>+</sup>等对酶活力影响较小。由此可知,在使用该酶时要注意Fe<sup>2+</sup>和Cu<sup>2+</sup>的影响。

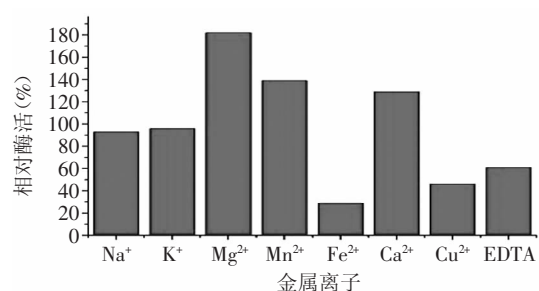


图6 金属离子对脂肪酶酶活的影响

Fig.6 Effect of metal ions on activity to lipase

**2.2.4 底物浓度对反应速率的影响** 选取2.5%、5%、10%、15%、20%、22.5%几个不同的底物浓度,研究底物浓度对反应速率的影响,结果见图7。底物浓度为20%时反应速率达到最大,即酶活最高,再增大底物浓度,酶活力不变。符合酶反应规律(米氏方程):其他条件不变,增加底物浓度,在底物浓度较低的情况下,反应速度随底物浓度的增加而加快。但底物浓度达到一定数值时反应速度趋向平衡。标准测定酶活力方法中底物的添加量为10%,而本实验中底物浓度达到20%时,酶活力不再升高,初步判断该酶存在产物抑制性,但抑制程度如何,我们还将在今后的实验中进行研究。

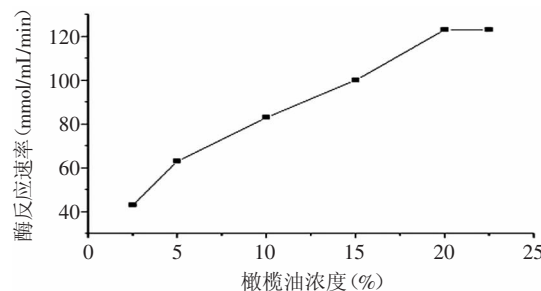


图7 底物浓度对反应速率的影响

Fig.7 Effect of substrate concentration on lipase reaction rate

**2.2.5 正交实验结果** 由前面的单因素实验可知该脂肪酶的最适pH为7.0,最适温度为45℃,Mg<sup>2+</sup>对酶活力有较强的促进作用,底物浓度为20%时酶活力达到



最大。在单因素最适合条件附近选择水平设计正交实验。实验结果见表2。

表2 正交实验结果

Table 2 The result of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	酶活(U/mL)
1	1	1	1	1	90.00
2	1	2	2	2	100.00
3	1	3	3	3	233.33
4	2	1	3	2	66.67
5	2	2	1	3	26.67
6	2	3	2	1	66.67
7	3	1	2	3	16.67
8	3	2	3	1	103.33
9	3	3	1	2	50.00
K <sub>1</sub>	423.33	173.34	166.67	260	
K <sub>2</sub>	160.01	230	183.34	216.67	
K <sub>3</sub>	170	350	403.33	276.67	
$\bar{K}_1$	141.11	57.78	55.56	86.67	
$\bar{K}_2$	53.34	76.67	61.11	72.22	
$\bar{K}_3$	56.67	116.67	134.44	92.22	
优水平	A <sub>1</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	D <sub>3</sub>	
极差R	87.77	58.89	78.88	20	
主次顺序	A>C>B>D				

根据表2的极差分析,得出实验因子的主次顺序如下:A(pH)>C(温度)>B(底物浓度)>D(Mg<sup>2+</sup>)。最优水平因素为A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>,即pH为6.5、底物浓度为20%、温度为50℃、Mg<sup>2+</sup>浓度为100mmol/mL。

### 3 结论

3.1 将基因工程菌X12-5活化后摇瓶发酵,进行上罐发酵,扩大培养,制成固体粗酶粉,测得酶活力220000U/g,目前在国内同行业中处于前列。说明该脂肪酶有较强的水解能力,在工业上具有广阔的应用前景。

3.2 对重组脂肪酶酶学性质研究表明:该脂肪酶的最适温度为45℃,在50℃以前保温60min的酶活保持在80%~90%之间,70℃仍能维持在30%左右,说明该酶有较好的热稳定性。最适pH为7.0,pH为10.0时耐受1h酶活力还可达到40%左右。说明该酶的pH耐受性较好。菌株X12-5产酶依赖于Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>。正交实验表明pH6.5,底物浓度20%,温度50℃,Mg<sup>2+</sup>100mmol/mL时脂肪酶酶活力最高。近几年,工业上对脂肪酶耐酸、耐碱、耐高温等特性提出了新的要求,而且已经成为国内外脂肪酶研究的一个重要方向<sup>[12]</sup>。

3.3 制革工业上要求脂肪酶在30~40℃有较好的稳定性,产物抑制作用较弱,酶的水解能力强,最好能

与表面活性剂相容。该重组脂肪酶具有较好的稳定性和较高的酶活力,且经过初步判定其产物抑制效果较弱。所以,该脂肪酶可能在制革工业中的脱脂、浸水、浸灰和软化等过程中使用,具有较广阔的应用前景。

3.4 我们将对该酶在制革工业上的应用做进一步研究。利用含大量油脂的绵羊皮为制革原料,探讨该脂肪酶在制革中的水解性能、是否存在底物特异性、产物抑制性的大小及与蛋白酶是否相容等方面的特征,为制革工业开发新型高质量的脂肪酶。

### 参考文献

- [1] Davis BG, Boyer V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis[J]. Nat Prod Rep, 2001, 18(6):618-640.
- [2] 韩四平. 嗜热脂肪酶的性质及其高效表达的研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2007:6-7.
- [3] 阎金勇, 杨江科, 徐莉, 等. 白地霉Y162脂肪酶基因克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 184-190.
- [4] 李彦春. 酶法生产绵羊服装革的关键技术及原理[D]. 成都: 四川大学, 2001.
- [5] 彭必雨, 于志森. 酶在制革中的应用[J]. 中国皮革, 1999, 28(23): 19-22.
- [6] Palanisamy Thanikaivelan, Jonnalagadda R Rao, Balachandran U Nair, et al. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing[J]. Trends in Biotechnology, 2004, 22(4): 181-188.
- [7] Choudhary RB, Jana AK. Enzyme technology applications in leather processing[J]. Indian Journal of Chemical Technology, 2004, 11(5): 659-671.
- [8] Fariha Hasan, Aamer Ali Shah, Abdul Hameed. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251.
- [9] 肖凯夫, 郭晟, 庞一林, 等. 产碱性脂肪酶热带假丝酵母LYSC-3的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 218-220.
- [10] 陈林林, 辛嘉英, 张颖鑫, 等. 粗状假丝酵母产脂肪酶发酵条件的优化[J]. 食品工业科技, 2010, 31(1): 183-185.
- [11] 施巧琴. 碱性脂肪酶的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 8(3): 108-110.
- [12] Sharma R, Soni S K, Vohra R M, et al. Purification and characterization of a thermo stable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-21[J]. Proc Biochem, 2002, 37: 1075-1084.

欢迎光临我们的网站

www.spgykj.com