

固定化少根根霉发酵产脂肪酶及催化合成单甘酯

尹春华, 傅四周, 徐家立, 谭天伟

(北京化工大学化学工程学院生物化工系, 北京 100029)

摘要:采用多种载体固定少根根霉细胞发酵产脂肪酶,发现珍珠岩和聚氨酯泡沫比较适合作固定化载体,发酵液酶活性比无载体直接发酵高 6~8 倍,而且产酶后固定化根霉细胞的废载体有较高酶活性,可直接作固定化细胞用于催化化学反应.对根霉脂肪酶的性质进行了初步探讨.提取的脂肪酶和固定化根霉细胞用于催化合成单甘酯,效果显著.

关键词:少根根霉;脂肪酶;固定化;单甘酯

中图分类号:TQ925

文献标识码:A

文章编号:1009-606X(2002)06-0534-05

1 前言

脂肪酶(Lipase, EC.3.1.1.3)又称甘油酯水解酶,广泛应用于皮革、皮毛、绢纺、食品、医药等行业.近些年来,随着非水相酶学研究的进展,人们发现脂肪酶在水溶液和非水介质中可以催化不同的反应,尤其是这些反应往往具有高度的立体选择性,可以用来制备化学方法难以合成的手性化合物(如光学活性药物、农药、液晶等),从而可以大大拓展脂肪酶的可能用途.

脂肪酶可从哺乳动物、植物和微生物中获得,微生物脂肪酶比动植物脂肪酶具有更广的作用 pH 和温度范围,而且来源广,易于工业化.微生物产脂肪酶中的根霉脂肪酶,由于具有较好的立体选择性,引起了人们的广泛重视^[3-5].传统的根霉发酵,菌体容易聚集成团,导致混合、供氧恶化,产酶受阻,酶活性较低^[6].采用载体固定根霉细胞发酵可以克服这一缺点,获得较高的发酵水平,而且发酵产酶后废载体经过简单处理,可作为固定化细胞用于催化反应.

单脂肪酸甘油酯(简称单甘酯),是一种重要的多醇类非离子型表面活性剂.单甘酯的生产目前化学法合成居于统治地位.化学法在高温(>220°C)下以碱为催化剂,产物主要是单甘酯与二甘酯的混合物(各占 45%左右),这条路线能耗大,反应产物易降解,分离提纯困难.而脂肪酶催化甘油解合成单甘酯反应条件温和,副产物少,容易提纯,日益受到关注^[1,2].

2 材料与方法

2.1 材料

少根根霉(*Rhizopus arrhizus* Buct-11),本实验室保藏;解脂假丝酵母脂肪酶,本实验室保存菌种所产;猪胰脂肪酶, Sigma 公司产品; Lipolase 100-T, Novo Nordisk 公司产品;棕榈油,北京化工厂,熔点 30°C;浮石,湖州化工厂;珍珠岩、聚氨酯泡沫(孔隙率 90%)、无纺布皆从市场购得;黄豆饼粉,食品级,市场购得;其它试剂为分析纯.

2.2 主要仪器

Backman 冷冻离心机; SHA-B 型水浴恒温振荡器,常州金城教学仪器厂; HYA 恒温摇床,中国科学院武汉科学仪器厂; Christ Alpha1-4 冷冻干燥仪.

收稿日期:2002-02-04, 修回日期:2002-07-31

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:29676001)

作者简介:尹春华(1972-),男,湖南省茶陵县人,博士研究生,生物化工专业;谭天伟,通讯联系人.

2.3 酶活力的定义和测定方法

用橄榄油乳化法测定脂肪酶活力^[7]。水解酶活力定义为:脂肪酶在 37°C 及 pH=7.0 条件下产生 1 μmol/min 脂肪酶所需的酶量,即为 1 个脂肪酶国际单位(U)。单甘酯分析采用高碘酸氧化法^[8]。

2.4 培养基

种子培养基和发酵培养基为(%) : 黄豆饼粉 3.0, 植物油(橄榄油)1.0, 硫酸铵 0.2, 硫酸镁 0.1, 磷酸氢二钾 0.5, pH=7.0。

2.5 实验方法

2.5.1 载体预处理

固体培养前,将载体预处理:将载体洗净,烘干,筛分,其中聚氨酯泡沫和无纺布剪成 2 mm 左右的小方块,浮石敲碎成颗粒状(直径约为 2 mm 左右)。处理后各种载体的大小基本一致。

2.5.2 细胞固定化

载体预处理后,加到 250 ml 的锥型瓶中,载体量约覆盖瓶底 3/4 的面积。再加入少量液体培养基,使载体吸至饱和,高压湿热灭菌(0.1 MPa, 30 min)。接入根霉孢子悬液,恒温(28±1)°C,培养 48 h。培养期间定时摇晃培养载体,使长满菌丝的载体分散,避免聚集成团。

2.5.3 固定化细胞培养

固定化细胞培养瓶中加入 50 ml 左右灭菌的液体培养基,在摇床中(28±1)°C 温度下恒温培养,转速 140 r/min,时间 72 h。

2.5.4 酶的提取

取出载体,用双层纱布滤得酶液,酶液放入低温冰箱(-10°C)冷冻 30 min,低温(-5°C)盐水浴,搅拌,加入一定体积的丙酮(经-15°C 冷冻过夜)进行沉淀,开始采用滴加,至加入体积达酶液的 20% 后加快速度。加入的丙酮体积是酶液的 3 倍。

酶液冷冻离心得到脂肪酶,再用丙酮洗涤,低温离心,重复 3 次。酶粉室温下直接风干、研碎,得到干酶粉。

3 结果与讨论

3.1 固定化细胞发酵

由于霉菌的菌丝或孢子与载体接触易于自然吸附,因此自然吸附操作简单,成本低,在霉菌固定中广泛采纳^[5]。本文采用珍珠岩等载体吸附少根根霉细胞发酵产脂肪酶,并与无载体直接发酵对比。实验发现,无载体发酵菌丝很快聚集成疏松蓬状物,混合供氧受阻,发酵水平很低;而载体固定化细胞发酵,菌丝围绕着载体颗粒生长,在培养基中呈分散均匀的小球,可获得较高的发酵水平。表 1 为实验结果。载体发酵所得的菌液酶活性与无载体液体直接发酵相比要高得多,其中以珍珠岩和聚氨酯泡沫最为明显,利用珍珠岩作为载体吸附根霉菌丝发酵所得酶活性是无载体直接发酵的 8 倍多。而蛭石和浮石则不理想,可能是因为蛭石为片状,且密度小,在固体培养阶段,菌丝长势很好,但极易成团,分散不好,在液体发酵阶段,成团浮在培养基表面;浮石吸附菌丝不好,所以两者皆不适宜作根霉细胞固定化载体。

表 1 不同载体固定化细胞发酵产酶的比较

Carrier	Perlite	Nonwovens	Polyurethane	Pumice	Vermiculite	Without carrier
End pH	5.5	5.2	6.0	5.5	6.2	5.4
Enzyme activity (U/ml)	125	25	99	17.5	9	15

3.2 脂肪酶的提取

从酶液中提取酶粉采用丙酮沉淀法. 实验中观察到, 当加入丙酮的体积是发酵液体积的 0.9 倍时, 溶液开始出现混浊, 即有酶蛋白质沉淀. 表 2 是体积为 100 ml (酶液活力为 122.5U/ml) 的 3 份酶液加入 2~4 倍丙酮时的实验结果. 表中数据显示, 丙酮为酶液体积 3 倍和 4 倍时的酶活收率相差不多, 而 4 倍时的单位酶活力却比 3 倍时低得多, 可能是因为大量丙酮把小分子的杂蛋白也沉淀下来了. 丙酮体积为 2 倍时所得酶粉水解酶活性最高, 但酶活性收率低. 综合考虑酶活性收率、酶活性和丙酮用量几个因素, 酶液沉淀时丙酮的体积为酶液的 3 倍为宜.

表 2 丙酮用量对酶活性的影响

Table 2 Effect of quantity of acetone on lipase activity

Acetone:fermentation broth (volume ratio)	Weight of lipase powder (g)	Activity of lipase powder (U/g)	Total activity of lipase powder (U)	Recovery of lipase activity (%)
2	1.72	4070	7000	57.1
3	2.22	4025	8935	72.9
4	2.58	3600	9288	75.8

3.3 水解酶的最适作用温度、最适 pH 值及热稳定性

3.3.1 水解酶的最佳作用 pH 值

在 pH=6.0~8.0 范围内, 测定了少根根霉(*Rhizopus arrhizus* Buct-11)脂肪酶在不同 pH 下的相对活性, 结果如图 1, 表明酶的最佳作用 pH 值为 7.0.

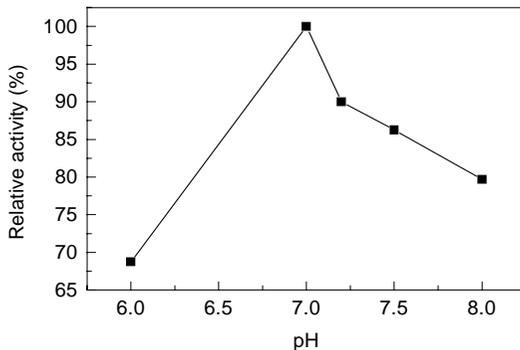


图 1 pH 对酶活力的影响

Fig.1 Effect of pH on lipase activity

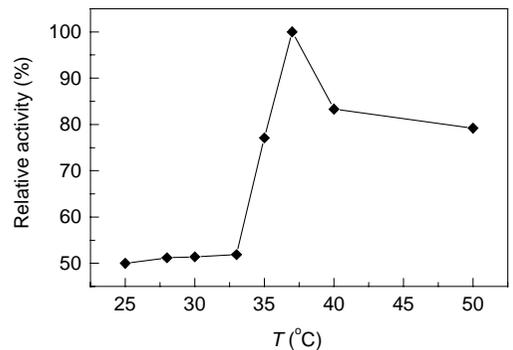


图 2 温度对酶活力的影响

Fig.2 Effect of temperature on lipase activity

3.3.2 水解酶的最佳作用温度

在 25~50°C 温度范围内, 测定了少根根霉(*Rhizopus arrhizus* Buct-11)脂肪酶在不同温度下的相对活性, 实验结果如图 2, 表明酶最适作用温度为 37°C.

3.3.3 酶的热稳定性

取 50 ml 酶液置于不同温度下保温, 每隔 10 min 取样测定剩余酶活性. 结果见图 3. 36°C 下酶基本没有失活, 41°C 保温 80 min 酶剩余 50% 的活性, 50°C 下酶失活严重, 80 min 时剩余不到 20% 的活性. 说明该脂肪酶的热稳定性一般.

3.4 固定化细胞的再利用

实验发现, 缠绕在载体上的菌丝还含有一定量的脂肪酶, 可以干燥后作为固定化细胞再利用. 将固定化细胞用去离子水漂洗 3 次, 再用丙酮冲洗 3 次, 冷冻干燥后测其活性, 实验数据见图 4.

其中聚氨酯泡沫固定化细胞酶活性最高,无纺布固定化细胞次之,珍珠岩固定化细胞酶活性很低。这可能是由于聚氨酯泡沫和无纺布疏松多孔,而且孔径大,菌丝能够长进载体内部;珍珠岩载体则由于菌丝主要包裹在表面,在处理过程中菌丝容易脱落,损失了部分酶活性。

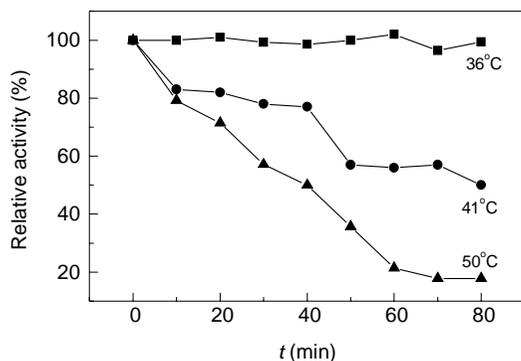


图3 酶的热稳定性
Fig.3 Thermal stability of lipase

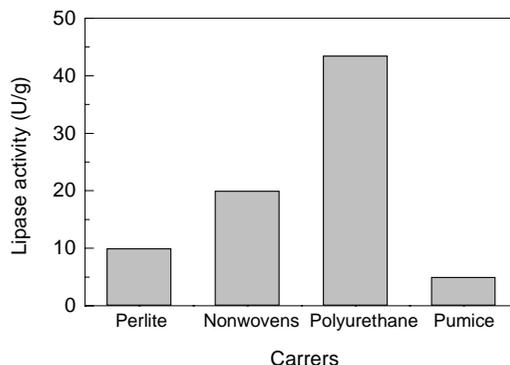


图4 载体对固定化细胞酶活的影响
Fig.4 Effect of carriers on lipase activity

为了得到酶活性较高的固定化细胞,再作以下处理:将聚氨酯泡沫固定化细胞放入锥形瓶中,加入一定体积和 pH 值的磷酸缓冲液,再加入一定量的表面活性剂,浸泡 24 h,真空冷冻干燥后测其表现水解酶活性,实验数据见表 3。结果表明,在聚氨酯固定化细胞冻干前,调节其 pH 和加入表面活性剂处理,有利于改善其活性。原因可能是适宜的 pH 使脂肪酶形成更好的活性构象(这里的固定化细胞处理 pH 与游离酶的最佳作用 pH 值一致)。表面活性剂具有亲、疏水基团,改善了脂肪酶的微环境和底物的传递^[9]。

表 3 固定化细胞的处理

Table 3 Treatment of immobilized cells

pH	-	6.0	7.0	7.0	8.5
Surfactant (ml)	-	-	-	0.5 (Span80)	0.5 (Span80)
Activity of immobilized cells (g/L)	43.5	45	63.5	118.3	57.5

3.5 酶催化合成单甘酯

大多数微生物产的脂肪酶催化合成单甘酯几乎均发生在甘油的 1 位,具有 1 位置专一性。本实验采用甘油解反应合成单甘酯。将 10 g 棕榈油和含一定量水的甘油 2.4 g 混合,加入适量脂肪酶,在各自最佳的反应条件下进行反应,实验结果如表 4。

表 4 酶催化合成单甘酯

Table 4 Synthesis of monoglyceride by lipase

Lipase	t (h)	Content of water (%)	Quantity of lipase (U)	T (°C)	Content of monoglyceride (%)	Productivity of monoglyceride [mg/(U·h)]
RAL ¹⁾	24	4.0	1020	26	35.1	0.18
CCL ²⁾	24	4.0	5000	30	2	0.002
ICL ³⁾	36	3.0	80 ⁶⁾	28	29.0	1.24
L-100T ⁴⁾	72	4.0	120 ⁶⁾	30	39.1	0.56
PPL ⁵⁾	24	4.0	800	30	22.1	0.14

Note: 1) *Rhizopus arrhizus* lipase; 2) *Candida cylindracea* lipase; 3) immobilized *Rhizopus arrhizus* cells with polyurethane;

4) lipolase 100T; 5) porcine pancreas lipase; 6) apparent lipase activity.

结果表明,水解酶活性和催化合成单甘酯的能力没有相应关系。不具位置选择性的解脂假丝

酵母几乎不催化合成单甘酯；Novo. Lipolase-100T、猪胰脂肪酶具有 1 位置选择性，生成物中单甘酯的含量都比较高。少根根霉游离脂肪酶和产酶后聚氨酯泡沫固定化细胞(经简单处理)也获得了较高的单甘酯含量，而且后者具有最高的单位酶活性催化合成单甘酯能力，说明该少根根霉脂肪酶具有较好的 1 位置专一性。洗去酶液后的聚氨酯固定化根霉细胞经过简单处理也可用于单甘酯的合成，有很高的实用性。

4 结论

(1) 研究了珍珠岩等 5 种载体固定少根根霉细胞发酵产脂肪酶，相对于无载体少根根霉直接发酵，混合、供氧得到改善，发酵水平有很大的提高，其中珍珠岩固定化发酵酶活性比直接发酵高 8 倍，聚氨酯泡沫也达 6 倍多，而且洗去酶液后载体还可作为固定化细胞用于单甘酯的合成。

(2) 初步研究了少根根霉粗酶的性质，最适作用 pH 值是 7.0，最适作用温度为 37°C。

(3) 应用少根根霉脂肪酶和固定化少根根霉细胞催化合成单甘酯，效果明显。

参考文献：

- [1] McNeill G P, Yamane T. Further Improvements in the Yield of Monoglycerides during Enzymic Glycerolysis of Fats and Oils [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1991, 68(1): 6-10.
- [2] McNeill G P, Shimizu S, Yamane Tsuneo. High-yield Enzymic Glycerolysis of Fats and Oils [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1991, 68(1): 1-5.
- [3] Ely Nahas. Control of Lipase Production by *Rhizopus Oligosporus* under Various Growth Conditions [J]. J. General Microbiology, 1988, 134: 227-233.
- [4] 金其荣, 许翥荣, 周义圣. 根霉菌脂肪酶的生产及酶特性的初步研究 [J]. 工业微生物, 1995, 25(1): 17-20.
- [5] 徐岩, 谢红想, 王栋, 等. 一株根霉产脂肪酶发酵条件的研究 [J]. 工业微生物, 1999, 29(1): 6-9.
- [6] 李学梅, 林建平, 岑沛霖. 霉菌固定化综述 [J]. 生物工程进展, 1999, 19(4): 62-66.
- [7] Watanabe N, Yasuhide O, Yasuji M. Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganisms, Cultural Conditions and Some Properties of Crude Enzyme [J]. Agric. Bio. Chem., 1997, 4: 1353-1358.
- [8] 吕德水, 石明孝, 金刚. 单脂肪酸甘油酯总含量的测定 [J]. 日用化学工业, 1996, 3: 39-44.
- [9] 徐岩, 章昌昌. 有机相酶促反应中固定化脂肪酶的非共价修饰 [J]. 无锡轻工大学学报, 1998, 17(4): 15-19.

Lipase Production by Immobilized *Rhizopus arrhizus* Cells and Enzymatic Synthesis of Monoglyceride

YIN Chun-hua, FU Si-zhou, XU Jia-li, TAN Tian-wei

(Department of Bioengineering., School of Chemical Engineering,
Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Lipase production by fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus* was studied, in which the lipase activity by perlite adsorbition *Rhizopus* cells reached 125 U/ml, 8 times as that by fermentation without carriers. The immobilized *Rhizopus arrhizus* cells on carriers after fermentation also showed high lipase activity. Synthesis of monoglyceride by lipase and the immobilized cells on carriers after fermentation was tested, and proved to be an effective method for production of monoglyceride.

Key words: perlite; immobilized cell; monoglyceride; *Rhizopus arrhizus*