

Penicillium expansum PED-03 固态发酵产脂肪酶及酶学性质研究

罗珊珊 戴大章 夏黎明

(浙江大学化学工程与生物工程学系, 杭州, 310027)

摘 要 利用 *Penicillium expansum* PED-03 固态发酵产脂肪酶, 选用麸皮为碳源、豆粕为氮源, $m(\text{麸皮})/m(\text{豆粕})$ 比为 1:4, 适宜含水量为 50% (V/W), 在 24℃ 下发酵 4 d, 脂肪酶活力可达 1 596 U/g。该酶的最适温度为 35℃, 在 50℃ 以下较为稳定; 最适 pH 值为 9.5, 在 pH 6.0~10.0 范围内有明显的催化活性; 适宜浓度的 Na^+ 、 Ca^{+2} 、 Mg^{+2} 对酶反应有促进作用, 而 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 等对酶反应有不同程度的抑制作用。利用 *P. expansum* PED-03 脂肪酶在非水相中对外消旋烯丙醇酮(4-羟基-3-甲基-2-(2-烯丙基)-2-环戊烯-1-酮, allethrolone) 进行酶法拆分, 35℃ 反应 36 h 时转化率(C)可达理论值的 96%, 产物的对映体过量值(ee_p)可达 99%, 显示了良好的应用潜力。

关键词 脂肪酶, 固态发酵, 酶学性质, 酶法拆分, 烯丙醇酮

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^[1]。近年来, 由于脂肪酶在酯类改性, 制备特种油脂以及手性化合物的拆分等方面的应用, 它的研究引起了国内外学者的广泛关注^[2, 3]。脂肪酶在微生物中分布很广, 据统计, 细菌有 28 个属、放线菌 4 个属、酵母菌 10 个属、其他真菌 23 个属共计达 65 个属的微生物产脂肪酶^[4]。在产脂肪酶的微生物当中, 由于真菌的脂肪酶多为胞外酶, 较易分离提取, 而真菌又易于培养, 因此在酶制剂工业中深受青睐。

笔者从本实验室已有的产脂肪酶菌株中筛选到 1 株脂肪酶高产真菌 *Penicillium expansum* PED-03, 并对其液态发酵产脂肪酶进行了初步研究^[5]。研究发现, 虽然 *P. expansum* PED-03 能产生高活力的脂肪酶, 但液态发酵后期的发酵液过于粘稠, 造成发酵罐产酶时搅拌阻力过大和动力能耗剧增。而固态发酵无需搅拌, 可克服这些缺点。且固态发酵中可利用麸皮代替液态发酵的淀粉作碳源和部分氮源, 降低生产成本。因此, 文中对 *P. expansum* PED-03 固态发酵产脂肪酶进行了探讨, 并对该酶在烯丙醇酮(4-羟基-3-甲基-2-(2-烯丙基)-2-环戊烯-1-酮, allethrolone) 酶法拆分上的应用作了进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种

Penicillium expansum PED-03, 本实验室保藏菌

种。

1.1.2 培养基

斜面培养基: 新鲜马铃薯去皮, 切成薄片, 称取 200 g, 加蒸馏水 1 L, 煮沸 30 min, 用纱布过滤, 冷却后再加入葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水定容到 1 L, 并调节 pH 值为 7.0, 121℃ 灭菌 20 min。

种子培养基: 豆饼粉 4 g, 淀粉 0.6 g, Na_2HPO_4 0.2 g, K_2SO_4 0.3 g, MgSO_4 0.3 g, FeSO_4 0.015 g, CaCO_3 0.5 g, 自来水 100 mL, 并调节 pH 值为 5.5~6.0, 121℃ 灭菌 20 min。

产酶培养基: 将新鲜麸皮粉碎后和豆粕按一定比例混合, 然后加入到 250 mL 三角烧瓶中, 再加入一定比例的蒸馏水, 搅合均匀后高压灭菌备用。

1.2 方 法

1.2.1 培养方法

种子培养: 将菌种由培养斜面接种到 50 mL (250 mL 三角瓶) 液体培养基中, 于 26℃、200 r/min 条件下恒温振荡培养 60~62 h, 制成液体菌种。

摇瓶发酵产脂肪酶: 按 0.1 mL/g 的接种量将液体菌种接入到 30 g 产酶培养基中, 将三角瓶置于 24℃ 培养箱中静置培养, 定期取样测定酶活。

1.2.2 粗酶液的制备

取 1 g 鲜曲, 加蒸馏水 50 mL, 将酶曲充分捣碎后, 于 4℃ 下缓慢搅拌, 浸提 3 h, 4 层纱布过滤, 离心 (4 800 r/min, 15 min) 后的上清液即为粗酶液。

1.2.3 脂肪酶活力测定

采用改进的橄榄油乳化法定量测定^[6]。以分解底物(橄榄油)释放出 1 $\mu\text{mol/min}$ 游离脂肪酸所需酶量定义为 1 个碱性脂肪酶活力单位(U)。

第一作者: 硕士研究生。

收稿日期: 2005-09-26, 改回日期: 2005-01-14

1.2.4 外消旋烯丙醇酮的酶法拆分

在自制恒温水浴反应器中加入外消旋烯丙醇酮 5 g、醋酸乙烯酯 80 mL 和分子筛 3 g, 再按 500 U/g 烯丙醇酮比例加入一定量的粗酶液, 于 35℃ 下搅拌反应。反应中定时取样, 采用气相色谱分析跟踪检测反应进程。

1.2.5 反应转化率(C)与对映体过量值(ee)测定

采用气相色谱以内标法定量测定。内标物: 丁二酸二乙酯。色谱条件: 手性毛细管柱, HP-FFAP (30 m×0.32 mm×0.2 μm); H₂ 流量 30 mL/min; 载气 (N₂) 流量 25 mL/min; 空气流量 30 mL/min; 分流比 5:1; 柱温 170℃; 汽化室温度 210℃; 检测器温度 270℃。烯丙醇酮及其乙酯的对映体过量值(ee)以及转化率(c)按下式计算^[7, 8]:

$$ee(\%) = (S - R) / (S + R) \times 100$$

$$c(\%) = ee_S / (ee_S + ee_P) \times 100$$

式中, S 和 R 分别为气相色谱测得样品中 S 和 R 对映体的含量, ee_S 及 ee_P 分别为烯丙醇酮及其乙酯的对映体过量值。

2 结果与讨论

2.1 影响产酶的主要因素

2.1.1 碳氮比

选择麸皮和豆粕为培养基的碳源和氮源, 改变两者的混合比例, 比较不同碳氮比(以麸皮与豆粕粉的质量比)对该菌株产酶的影响, 结果如表 1 所示。结果表明, *P. expansum* PED-03 在较低碳氮比的培养基上产生较高活性的脂肪酶, 而且在麸皮与豆粕粉比例为 1:4 时酶活最高, 达到 1596 U/g, 比原先的 2:3 提高近 24%。

表 1 不同碳氮比对产脂肪酶的影响

<i>m</i> (麸皮): <i>m</i> (豆粕)	酶活/U·g ⁻¹	产率/U·(g·d) ⁻¹
5:0	741	185
4:1	756	189
3:2	1 194	299
2:3	1 294	324
1:4	1 596	399
0:5	1 475	369

2.1.2 培养温度

在不同的培养温度下进行发酵产酶, 考察温度对 *P. expansum* PED-03 产酶的影响, 结果见图 1。由图 1 可见, 培养温度以 24℃ 为宜。当培养温度较低时(22℃), 由于菌体生长缓慢, 酶活力偏低。但培养温度过高时酶活明显降低, 而当温度超过 28℃ 时, 菌

体迅速老化, 酶活力急剧降低; 30℃ 时酶活仅为 24℃ 时的 53%。

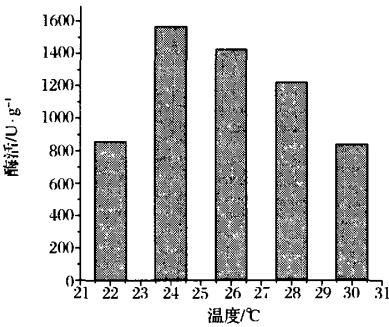


图 1 温度对 *P. expansum* PED-03 产酶的影响

2.1.3 培养基含水量

改变培养基中水分的比例(用固形物与水的质量比)进行产酶试验, 考察培养基含水量对 *P. expansum* PED-03 脂肪酶活力产生的影响, 如表 2 所示。

表 2 含水量对产酶的影响

<i>m</i> (水): <i>m</i> (固)	1:0.75	1:1	1:1.5	1:2	1:2.5
相对酶活力/%	57	100	51	44	35

固体培养基的含水量对脂肪酶的发酵有着重要影响。由于 *P. expansum* PED-03 的生长对水的体积分数有较高的要求, 加水量太少, 无法满足所需湿度; 而加水量过多, 不利于固体培养基的通风和散热。对于麸皮/豆粕固体培养基, 其培养基中水分的最适质量比为 1:1, 此时脂肪酶酶活达到最高。

2.2 产酶进程

于不同培养时间取样, 测定 *P. expansum* PED-03 脂肪酶酶活力。从图 2 中可看出, 发酵初期酶活逐渐上升, 培养至第 4 天时, 产酶量达到最高水平。培养初期, 培养基中有少量白色菌丝产生, 此时酶活较低; 当培养基内布满白色菌丝时酶活力迅速增加; 培养至 96 h 后, 培养基中开始有绿色孢子产生, 此时

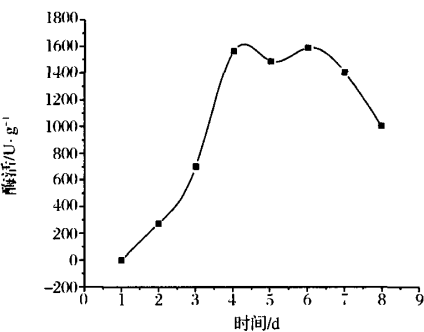


图 2 *P. expansum* PED-03 产脂肪酶的时间进程

酶活达到最高;随着孢子的增多,酶活开始降低。

2.3 酶学性质

2.3.1 酶反应的最适 pH

以橄榄油为底物,在不同 pH 值条件下测定 *P. expansum* PED-03 脂肪酶活力,以最高酶活为 100%。结果(图 3)表明,该酶的最适 pH 值为 9.5,在 pH 7~10 范围内其活力可保持在最大值的 80% 以上,可见该酶属碱性脂肪酶。

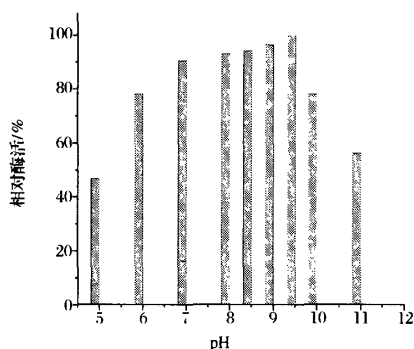


图3 pH值对 *P. expansum* PED-03 脂肪酶活力的影响

2.3.2 酶的 pH 值稳定性

将 *P. expansum* PED-03 脂肪酶液与等量不同 pH 值的缓冲液在 4℃ 下保存 24 h 后测定酶活(图 4),从图 4 中可以看出,该酶在 pH 7.0~10.0 范围内较为稳定,有较强的耐碱性。

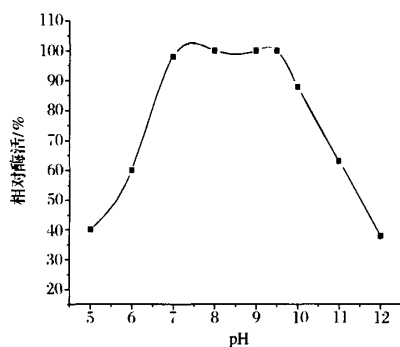


图4 *P. expansum* PED-03 脂肪酶的 pH 稳定性

目前大多数洗涤溶液都保持在较高的碱性条件下,pH 值可能达到 9.0,甚至 10.0,这就要求洗涤剂中的酶制剂作用 pH 和稳定 pH 均应在碱性范围内。*P. expansum* PED-03 脂肪酶的最适 pH 值为 9.5 且具有较强的耐碱性,非常适合作洗涤剂用酶,具有较大的开发价值。

2.3.3 酶反应最适温度

将 *P. expansum* PED-03 粗酶液置于不同温度条件下测定脂肪酶活力,由图 5 可以看出,该酶的最

适反应温度为 35℃。

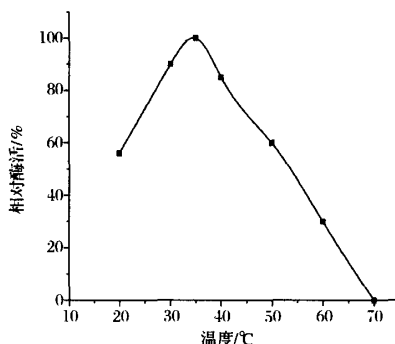


图5 温度对 *P. expansum* PED-03 脂肪酶活力的影响

值得注意的是,该酶在 25~40℃ 有明显的催化活性,其活力可达到最适反应温度时的 75% 以上,这意味着该酶的催化反应可以在室温条件下进行,由于反应条件温和、能耗低、副产物少,在工业化应用中具有明显的优势。

2.3.4 酶的热稳定性

将 *P. expansum* PED-03 粗酶液在不同的温度下保持 1 h 后测定剩余酶活力,结果见图 6。由图 6 可知,该酶在 50℃ 以下时较为稳定;当温度高于 50℃ 时,酶活迅速下降,但 60℃ 时仍能保持 60% 以上的活力,可见该酶有较强的耐温能力。

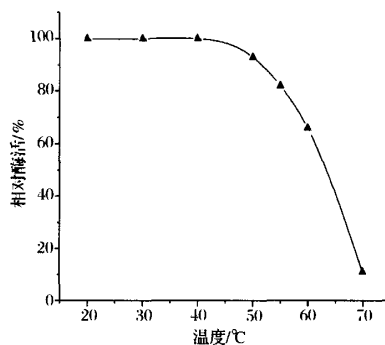


图6 *P. expansum* PED-03 脂肪酶的热稳定性

2.3.5 金属离子对酶活的影响

金属离子对酶活力的发挥有着重大的影响,它们与酶活性中心的相关基团作用,改变酶的构象,从而影响酶的活性。因此,在酶反应体系中加入一定浓度的金属离子,考察金属离子对酶活的影响。结果(表 2)表明,Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 对酶反应有促进作用;而 Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 等对酶反应有抑制作用。Cu²⁺、Hg²⁺ 对酶活性有强烈的抑制作用,可能是因为该酶

的活性中心含有巯基,它们和巯基结合,从而对活性与巯基有关的酶产生特别显著的抑制作用^[9, 10]。

表 2 金属离子对 *P. expansum* PED-03 脂肪酶活性的影响

金属离子	金属盐	离子浓度 × 10 ³ /mol · L ⁻¹	相对酶活 /%
-	-	-	100
Ca ²⁺	CaCl ₂	1	124
		10	150
Mg ²⁺	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1	116
		10	123
Na ⁺	NaCl	1	107
		10	112
K ⁺	KCl	1	98
		10	106
Zn ²⁺	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1	92
		10	88
Mn ²⁺	MnCl ₂ · 2H ₂ O	1	86
		10	75
Cu ²⁺	CuSO ₄ · 7H ₂ O	1	60
		10	52
Fe ²⁺	FeSO ₄ · 7H ₂ O	1	32
		10	25
Hg ²⁺	HgCl ₂	1	12
		10	0

注: -, 未加金属离子。

2.4 *P. expansum* PED-03 脂肪酶在外消旋烯丙醇酮手性拆分上的应用

非水相中 *P. expansum* PED-03 脂肪酶拆分外消旋烯丙醇酮的结果见表 3。经气相色谱检测,当反应器中的生物催化反应进行到 36 h 时,反应转化率(C)可达 48%(理论值为 50%),即理论值的 96%,说明 *P. expansum* PED-03 脂肪酶具有良好的催化性;对映体过量值(ee)可达 90%,说明 *P. expansum* PED-03 脂肪酶具有较好的立体选择性。

表 3 *P. expansum* PED-03 脂肪酶拆分外消旋烯丙醇酮

反应时间/h	ee _s /%	ee _p /%	C/%
12	51	99	34
24	77	99	44
36	90	99	48
48	91	99	48

拟除虫菊酯类杀虫剂是当今世界杀虫剂市场的 3 大支柱之一。烯丙醇酮是合成拟除虫菊酯类杀虫剂——丙烯菊酯的重要中间体,由拆分后的 S-烯丙醇酮合成的丙烯菊酯的杀虫活性是由外消旋烯丙醇酮合成的丙烯菊酯的 4 倍^[11]。因此先将外消旋烯丙醇酮进行拆分,得到 S-烯丙醇酮后再合成丙烯菊酯,可以大大降低其用量,从而减少毒性和保护环境。

外消旋烯丙醇酮的拆分一般采用化学方法^[11]。

然而,复杂的工艺和昂贵的拆分试剂大大限制了化学方法在实际中的应用。由于酶催化具有条件温和、选择性高、环境污染小等优点,如果能用酶催化的方法对外消旋烯丙醇酮进行拆分,就能在很大程度上简化生产工艺和降低生产成本^[12]。试验结果表明, *P. expansum* PED-03 脂肪酶有较强的生物催化性和立体选择性,显示了该酶在外消旋烯丙醇酮的生物催化拆分方面有着良好的应用前景。

参 考 文 献

1 Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases [J]. *Biotechnol Adv*, 2001, 19(8): 627~662

2 Ghanem A, Schurig V. Entrapment of *Pseudomonas cepacia* lipase with peracetylated β -cyclodextrin in sol-gel: application to the kinetic resolution of secondary alcohols [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, 14(17): 2 547~2 555

3 Tan T W, Wang F, Zhang H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride [J]. *J Mol Catalysis B: Enzymatic*, 2002, 18 (4): 325~331

4 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京:科学出版社, 1984. 655 ~670

5 Dai D Z, Xia L M. Enhanced production of *Penicillium expansum* PED-03 lipase through control of culture conditions and application of the crude enzyme in kinetic resolution of racemic allethrolone [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(4): 1 165~1 168

6 Abramic M, Lescic I, Korica T, et al. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus* [J]. *Enzyme Microbial Technol*, 1999, 25(6): 522~529

7 Ghanem A, Aboul-Enein H Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15(21): 3 331~3 351

8 Moon-Young Y, Lee S H, Cheong C S, et al. Resolution of 1,3-dioxolane derivatives using the lipase from an *Acinetobacter junii* SY-01 [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35 (6): 574~580

9 Abbas H, Hiol A, Deyris V, et al. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp. strain isolated from palm fruit [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31 (7): 968~975

10 Toida K, Kondoh M, Fukuzawa, et al. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(7): 1 199~1 203

11 张湘宁, 李 洁. 烯丙醇酮的化学拆分[J]. *农药*, 1993, 32(6): 12~14

12 郭 成, 曹 飞, 韦 萍, 等. 工业脂肪酶拆分烯丙醇酮 [J]. *精细化工*, 2000, 17(7): 396~397

(下转第 21 页)

- 中国轻工业出版社, 1994
- 6 Baret J A, Payne R W, Yarrow D. YEAST Characteristics and Identification [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1983
- 7 周小玲, 沈 微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89~92
- 8 詹谷宇, 田 萍. 酵母菌生物合成谷胱甘肽[J]. 药理学报, 1990, 25(7): 494~499
- 9 刘 娟, 何秀萍. 高产谷胱甘肽的酵母菌融合菌株的选育及其培养条件的研究[J]. 微生物学报 2003, 43(1): 99~103

Isolation and Primary Identification of Glutathion-producing Yeast Strains

Ai Lijing Rao Zhiming Shen Wei Fang Huiying Zhuge Jian

(Research Centre of Industrial Microorganisms and the Key Lab of Industrial Biotechnology,
Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

ABSTRACT 98 strains of yeast producing GSH were isolated from nature. Intracellular GSH was extracted by a simple and effective method. The yield of intracellular GSH of 2053⁺ was the highest in them after 30 h of fermentation. The results of fermentation showed that the highest dry cell weight of 2053⁺ reached 11.55 g/L at 28 h, while the highest intracellular GSH concentration arrived 49.74 mg/L at 30 h. In addition to general physiological and biochemical properties, the strain was identified by 18S rDNA sequence and systematic analysis. The results showed that 18S rDNA sequence of the strain had similarity of 99.75% with *Candida parapsilosis*, suggesting that the strain is a subspecies of *Candida parapsilosis*.

Key words isolate, glutathione, fermentation, *Candida parapsilosis*, subspecies

(上接第 17 页)

Production and Characterization of the Lipase from *Penicillium expansum* PED-03 with Solid State Fermentation

Luo Shanshan Dai Dazhang Xia Liming

(Department of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

ABSTRACT The lipase production was performed by *Penicillium expansum* PED-03 with solid state fermentation. The maximum lipase activity, 1 596 U/g was achieved at 24℃ for 4 d using bran as carbon source and soybean meal as nitrogen source (C/N=1:4) with 50% water (V/W). The lipase showed maximum activity at pH 9.5 and 35℃ and was stable within the pH range of 7.0~9.5. Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ stimulated the enzyme activity significantly, while Cu²⁺, Fe²⁺ and Mn²⁺ had an inhibitory effect. The resolution of allethrolone (4-hydroxy-3-methyl-2-(2-propenyl)-2-cyclopenten-1-one) catalyzed by the lipase from *P. expansum* PED-03 was carried out in a nonaqueous medium, and the reaction conversion (C) reached 96% of the theoretical value with perfect enantiomeric excess of product (ee_p=99%), presenting a good promise in the enzymatic resolution of allethrolone.

Key words Lipase, solid state fermentation, characterization, enzymatic resolution, allethrolone

信
息
窗

日本研究出一种新型食物保鲜剂——贝壳渣

日本日清公司研究了将虾壳、蟹壳、贝类的甲壳质废渣用盐酸处理,除去 CaCO₃ 等灰分,再用 NaOH 除去残留蛋白质,最后以 40%~45% 的 NaOH 高温洗脱,可得到一种高分子聚壳糖。聚壳糖有很强的抗菌作用,能作用于微生物的细胞表层,使霉菌的细胞表层受损而抑制其生长,因而被广泛地用于食品、果蔬的保存和保鲜中。它对抑制肉制品和水产品表面的细胞生长特别有效。抑菌率达 99.9% 以上,可使鲜肉在夏季的保质期达到 710d;用 1mg/L 质量浓度的聚壳糖溶液浸泡草莓、樱桃等鲜果和鲜蘑菇,保鲜期可延长到 8d 以上。在鲜鱼表面涂上 20~30mg/L 的聚壳糖液,即使在夏季,保鲜期也可达到 5d 以上。总之,聚壳糖的抑菌保鲜作用远优于化学合成的食品添加剂,对人体无副作用,也无残留,是理想的食物添加剂之一。