

酿酒酵母表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B 的酶学性质研究

黄登峰, 潘志友, 林影, 韩双艳, 郑穗平

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 本文对酿酒酵母表面展示南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) 的一般酶学性质进行研究, 得出结论: 酵母表面展示 CALB 在碱性条件下具有很好的稳定性和水解活性。其水解对硝基苯酚酯的最适反应 pH 值范围是 8.0~8.5, 与游离的 CALB 商品酶相比, 向碱性条件偏移。最适反应温度范围是 40~45 °C。最适反应底物为对硝基苯酚丁酸酯, 表现出极为明显的底物特异性。Ca²⁺、Mg²⁺对其有明显的激活作用。K⁺对其有微弱的激活作用。而 Co²⁺、Cu²⁺对其有明显的抑制作用。本研究为酵母表面展示脂肪酶的应用研究奠定理论基础。

关键词: 酵母表面展示; 南极假丝酵母脂肪酶 B; 全细胞催化; 酶学性质

中图分类号: Q556; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0627-04

Properties of *Candida antarctica* Lipase B Displayed on the Surface of *Saccharomyces cerevisiae*

HUANG Deng-feng, PAN Zhi-you, LIN Ying, HAN Shuang-yan, ZHENG Sui-ping

(School of Bioscience and Technology, Key Lab of Fermentation and Enzyme Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The properties of *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) displayed on yeast cell surface were studied in this paper. Catalytic activity of displayed CAL-B was measured in the hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters with various acyl chain lengths. The results showed that the optimal conditions of enzymatic hydrolysis were as follows: pH value of 8.0~8.5 and temperature of 40~45 °C. Displayed CALB was stable at pH 7.5~8.0 and remained 88% of activity after incubation at 40 °C for 4 h. Besides, the whole-cell biocatalyst showed high substrate specificity with *p*-nitrophenyl butyrate being of the most suitable substrate. It was also found that the lipase activity of the yeasts was enhanced by Ca²⁺ and Mg²⁺, but inhibited by Co²⁺ and Cu²⁺.

Key words: yeast surface display; *Candida antarctica* Lipase B; whole-cell biocatalyst; properties of enzyme

脂肪酶 (lipase, EC3.1.1.3) 广泛存在于动物、植物和微生物中, 不仅能催化油脂水解, 也能在非水相中催化酯合成、转酯化、酸解等反应。其中南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) 的用途最为广泛, 其在酯化^[1], 水解^[2], 转酯^[3], 及其他类型反应^[4]中都表现出比其它脂肪酶更为出色的催化活性, 广泛应用于食品、医药、洗涤剂化学合成和油脂等工业。

收稿日期: 2008-03-23

基金项目: 国家“863”科技攻关项目 (2006AA020203); 广东省科技攻关项目 (20062050168)

作者简介: 黄登峰 (1984-), 男, 湖北麻城人, 硕士研究生, 主要从事酶工程方面的研究

通讯作者: 林影, 教授

采用游离脂肪酶为催化剂, 酶的再生、循环使用困难, 而固定化脂肪酶 (如 Novo435) 价格昂贵, 应用于工业化大生产成本过高。以表面展示有脂肪酶的酿酒酵母全细胞作为催化剂, 具有固定化酶的优点, 且酶制剂生产工艺简单, 将发酵液直接离心收集菌体, 无需固定化即可用于生产, 反应后离心收集菌体即可重复利用, 大大降低生产成本^[5]。酿酒酵母已广泛用于食品工业, 其取代化学载体固定化脂肪酶完全符合绿色食品的要求。因此基于酿酒酵母细胞表面体系开发一系列的新型酶制剂具有重要的意义。对于这一有潜在应用价值的新型酶制剂, 有必要对其一般酶学性质进行研究, 找出最适反应条件, 为其在生产中的应用提供依据。本文研究了 pH 值、温度和金属阳离子等因素对酵母表面展示 CALB 的稳定性和水解活性的

影响,同时考察了酵母表面展示CALB的底物特异性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

重组菌株 *Saccharomyces cerevisiae* pICAS-celAL-CALB (*MATa*, *ade*, *his3*, *leu2*, *ura3*) 由本人构建。阴性对照重组菌株 *Saccharomyces cerevisiae* pICAS (*MATa*, *ade*, *his3*, *leu2*, *ura3*) 本实验室保存。

1.1.2 培养基

无氨基酸酵母氮源YNB (Yeast Nitrogen Base), 蛋白胨均购自Difco公司; 酵母抽提物购自Oxford公司; 酸水解干酪素购自Sigma公司; 氨基酸, 核苷酸购于广州市博理生物技术有限公司。菌种保藏及扩大培养基采用SD培养基 (YNB 0.67%, 葡萄糖2%, 微量的氨基酸, 核苷酸)。摇瓶产酶培养基采用SDC培养基, 为SD培养基中添加2%酸水解干酪素。固体平板添加2%的琼脂。

1.1.3 试剂

对硝基苯酚丁酸酯 (pNPB)、对硝基苯酚辛酸酯 (pNPC)、对硝基苯酚月桂酸酯 (pNPL)、对硝基苯酚棕榈酸酯 (pNPP) 购于Sigma公司。其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 酿酒酵母表面展示CALB的制备

将重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS-celAL-CALB 和阴性对照重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS 同批次接种单个菌落到SD种子培养基, 24 h后转接到SDC产酶培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养4 d, 7000 r/min、4 °C离心10 min, 弃上清, 用去离子水洗涤菌体三次, 重悬菌体即得酶液。

1.2.2 酿酒酵母表面展示CALB酶活力测定

采用吸光度法测定脂肪酶活力^[6]。

用50 mmol/L 缓冲液配制浓度为2 mmol/L 的对应的对硝基苯酚酯作为酶反应的底物, 其中添加0.5%的Triton-X 100。在0.5 mL浓度为2 mmol/L 的底物溶液加入0.5 ml的适当浓度的菌体重悬液, 适当温度下反应一定时间, 测定OD₄₀₅值。每个样品均测定3个平行样。用转化有空载体pICAS的重组菌株 *S. cerevisiae* pICAS 菌体重悬液作空白对照。1个酶活力单位定义为每分钟水解底物生成1 μmol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.3 酿酒酵母表面展示CALB的最适pH和pH稳定性

最适pH: 酶反应体系中缓冲液的pH值分别为5.8、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 以pNPB为底物, 30 °C测定其水解活力。重复3次。

pH值稳定性: 用pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、7.5、8.0、9.0的缓冲液洗涤菌体三次, 重悬后, 20 °C恒温放置24 h, 再用pH 8.0的缓冲液洗涤菌体三次, 以pNPB为底物, 30 °C测定其残余水解活力。重复3次。

1.2.4 酿酒酵母表面展示CALB的最适温度和温度稳定性

最适温度: 用pH 8.0的缓冲液重悬菌体, 以pNPB为底物, 测定酿酒酵母表面展示CALB在25 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C下的水解活性。

温度稳定性: 以pH 8.0的缓冲液重悬菌体, 在40 °C、45 °C、50 °C、60 °C、70 °C分别保温不同时间后, 以pNPB为底物, 测定酿酒酵母表面展示CALB在40 °C下的水解活性。

1.2.5 金属阳离子对酿酒酵母表面展示CALB水解活性的影响

在pH 8.0含有不同浓度的KCl、CaCl₂、MgCl₂、CuCl₂、CoCl₂的反应体系中, 以pNPB为底物, 在40 °C下测定酿酒酵母表面展示CALB的水解活性与不同浓度和种类金属阳离子的关系。

1.2.6 酿酒酵母表面展示CALB的底物特异性

用pH 8.0的缓冲液重悬菌体, 以对硝基苯酚丁酸酯 (C₄)、对硝基苯酚辛酸酯 (C₈)、对硝基苯酚月桂酸酯 (C₁₂)、对硝基苯酚棕榈酸酯 (C₁₆) 为底物, 30 °C测定其水解活力。重复3次。

2 结果与分析

2.1 pH对酿酒酵母表面展示CALB水解活性的影响

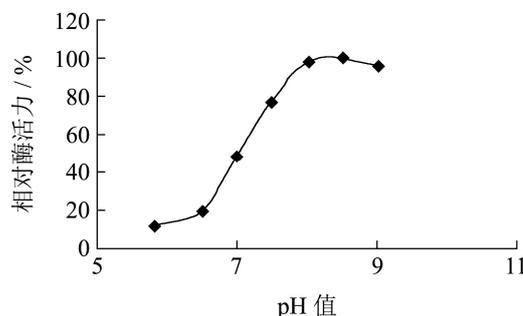


图1 pH对酿酒酵母表面展示CALB水解活性的影响

Fig.1 Effect of pH on the activity of CAL-B displayed at yeast cell surface

如图1, pH值为6.5时酿酒酵母表面展示CALB水解活性仅为最高活性的20%, pH值达9.0时其水解活性为最高活性的95%。酿酒酵母表面展示CALB在pH值

在5.8~8.5之间时,其水解活性呈不断上升趋势,当反应体系的pH值为7.5~9.0之间,表现出较高的水解活性,为最高活性的75%以上。最高水解酶活出现在pH 8.0~8.5,而后酶水解活性呈下降趋势。在偏碱性条件下,呈现出较高的水解活性。与游离的CALB商品酶相比(最适反应pH为7.0左右)^[7],酿酒酵母表面展示CALB在水相中的最适反应pH向碱性条件偏移。

2.2 pH对酿酒酵母表面展示CALB稳定性的影响

结果如图2所示,用pH值为3.0~7.5之间的缓冲液处理24 h (20 °C),酿酒酵母表面展示CALB的稳定性随pH值的增加而增加。其在pH 7.0~8.5之间的缓冲液中处理24 h (20 °C)后仍保持85%以上的水解活力,pH值7.5时酶的稳定性最大,而后酶的稳定性呈下降趋势。该酶在酸性条件下稳定性较差,在pH值为3时,其水解酶活仅残余20%左右。由此表明,酿酒酵母表面展示CALB在偏碱性条件下具有较好的稳定性。

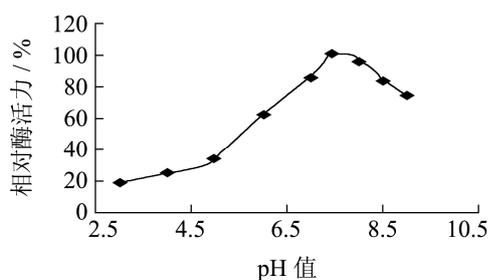


图2 酿酒酵母表面展示CALB的pH稳定性

Fig.2 The pH stability of CAL-B displayed at yeast cell surface

2.3 反应温度对酿酒酵母表面展示CALB水解活性的影响

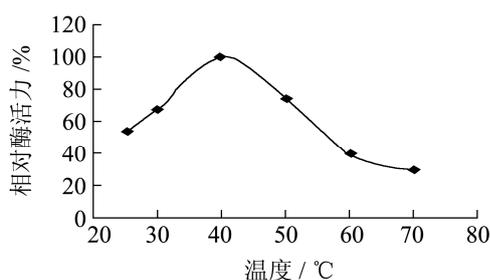


图3 反应温度对酿酒酵母表面展示CALB水解活性的影响

Fig.3 Effect of temperature on the activity of CAL-B displayed at yeast cell surface (pH=8.0)

如图3所示,酿酒酵母表面展示CALB在30~50 °C范围内水解活力较高,相对水解酶活在70%以上。当反应温度为40 °C时,酿酒酵母表面展示CALB的水解活性最高。当温度高于40 °C时,其水解酶活随着温度的升高开始下降,70 °C时其相对酶活仅为30%左右。其原因可能是温度偏高造成部分酶失活。

2.4 酿酒酵母表面展示CALB的热稳定性

如图4所示,酿酒酵母表面展示CALB在40 °C恒温4 h,保持88%以上的水解酶活力。在45 °C时的半衰期也在5 h以上。50 °C时的半衰期约为20 min。而在60 °C、70 °C时恒温处理10 min,其水解酶活降至20%以下,恒温处理4 h时,其水解活力仅存3%左右。总的来看,酿酒酵母表面展示CALB具有一定的热稳定性。

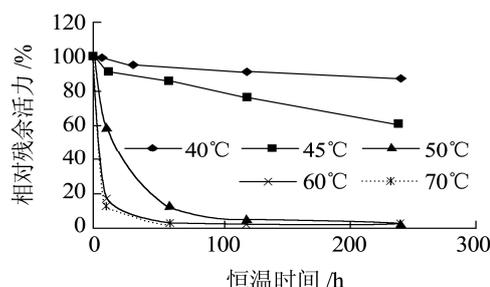


图4 酿酒酵母表面展示CALB的热稳定性

Fig.4 Thermostability of CAL-B displayed at yeast cell surface at different temperature (pH=8.0)

2.5 不同金属阳离子对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性的影响

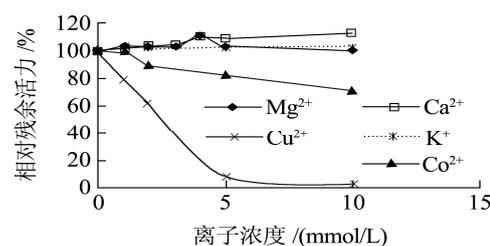


图5 不同金属阳离子对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性影响

Fig.5 Effect of various cation on the activity of CAL-B displayed at yeast cell surface (pH=8.0)

如图5所示, Ca²⁺对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性有明显的激活作用。4 mmol/L的Mg²⁺对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性也有较好的激活作用。K⁺对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性有微弱的激活作用。Co²⁺、Cu²⁺对酿酒酵母表面展示CALB的水解活性有明显的抑制作用。在反应体系中添加10 mmol/L的Co²⁺时酿酒酵母表面展示CALB的相对水解活性只保持70%左右。添加2 mmol/L的Cu²⁺时酿酒酵母表面展示CALB的相对水解活性只保持62%左右,添加5 mmol/L的Cu²⁺使酿酒酵母表面展示CALB的水解活性完全被抑制。

2.6 酿酒酵母表面展示CALB的底物特异性

以不同碳链长度的对硝基苯酚酯(脂肪酸碳链长度分别为4、8、12、16)为底物测定酿酒酵母表面展示CALB的水解酶活。结果如图6所示,随着底物的脂肪酸碳链长度的增加,酿酒酵母表面展示CALB表现

出明显的底物选择性,其水解酶活明显下降。水解对硝基苯酚丁酸酯(C₄)的酶活分别是水解对硝基苯酚月桂酸酯(C₁₂)和对硝基苯酚棕榈酸酯(C₁₈)的87倍和240倍。在平板检测中有同样的结果,细胞表面展示CALB的酿酒酵母重组菌株能在三丁酸甘油酯平板上形成明显的水解圈,而在橄榄油平板上其水解活力很微弱(另撰文报道^[8])。因此,酿酒酵母表面展示CALB的最适反应底物是C₄。

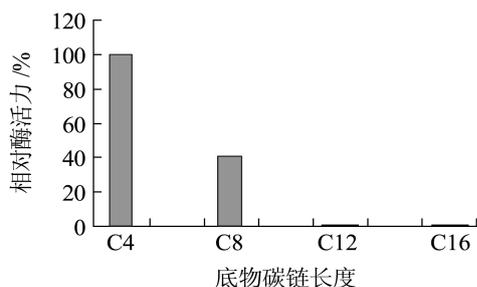


图6 酿酒酵母表面展示CALB底物特异性

Fig.6 Substrate specificity of CAL-B displayed at yeast cell surface (pH=8.0)

3 讨论

近年来,酵母表面展示技术广泛应用于蛋白的表达^[9]、酶的定向进化和筛选、微生物净化环境^[10]等方面,并已取得了重大的成果。酵母细胞展示的酶蛋白不需经过纯化可直接用作全细胞催化剂,酿酒酵母细胞为FDA认证的安全微生物,可以广泛应用于食品工业中。展示有酶蛋白的酿酒酵母全细胞既可直接作为食品或饲料添加剂,还可全细胞催化生产食品添加剂^[11]、医药化工原料等。本实验室开展的酿酒酵母表面展示脂肪酶全细胞催化生产短链芳香酯、甘油二酯和生物柴油的研究工作,已取得重要进展。

酿酒酵母表面展示南极假丝酵母脂肪酶B在碱性条件下具有很好的稳定性和水解活性。其水解对硝基苯酚酯的最适反应pH值范围是8.0~8.5,与游离的CALB商品酶相比,向碱性条件偏移。最适反应温度范围是40~45℃。在20℃、pH 7.5~8.0之间该酶能保持较好的稳定性,在40℃恒温4h,仍能保持88%以上的水解活力。酵母表面展示CALB具有极为明显的底物特异性,其偏向于作用短链底物,对硝基苯酚丁酸酯为其最适反应底物。Ca²⁺对其水解活性有明显的激活作用。4 mmol/L的Mg²⁺对其水解活性有较好的激活作用。K⁺也对其有微弱的激活作用。而Co²⁺、Cu²⁺对其水解活性有明显的抑制作用。

参考文献

- [1] Yan X, Dong W, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 18:29-37
- [2] Michael J. H, Robert V, Brian M, et al. Enzymatic Hydrolysis of a Prochiral 3-Substituted Glutarate Ester, an Intermediate in the Synthesis of an NK1/NK2 Dual Antagonist[J]. Adv. Synth. Catal., 2001, 343:744-749
- [3] Senanayake S, Shahidi F. Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification[J], Food Chemistry, 2004, 85(4): 489-496
- [4] Gotor-Fernández V, Busto E, Gotor V. Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds[J]. Advanced synthesis & catalysis, 2006, 348: 797-812
- [5] Kondo A, Udea M. Yeast cell-surface display—applications of molecular display[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 28-40
- [6] Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, et al. Extracellular Lipase of Pseudomonas sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(15): 4836-4841.
- [7] Ole Kirk, Morten Wurtz Christensen. Lipases from Candida antarctica: Unique Biocatalysts from a Unique Origin [J]. Organic Process Research & Development, 2002, 6:446-451
- [8] 潘志友,韩双艳,林影,等.南极假丝酵母脂肪酶 B 的酿酒酵母表面展示及其催化己酸乙酯的合成[J].生物工程学报,2008,24(4):673-678
- [9] Mitsuyoshi U, Atsuo T. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18:121-140
- [10] Kuroda K, Ueda M, Shibasaki S, et al. Cell surface-engineered yeast with ability to bind, and self-aggregate in response to copper ion [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59 (2): 259-264
- [11] Hisayori S, Yasuya F, Jun K, et al. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and α -amylase[J]. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18: 149-153