

# 施氏假单胞菌中不同细胞组分的脂肪酶合成活性研究

辛璇, 李晓凤, 唐语谦

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以具有高合成活性的施氏假单胞菌为研究目标, 采用超声破碎-溶剂提取等方法分离制备各细胞组分的粗脂肪酶, 以非水介质中的合成活性为表征指标, 测定了在非水介质中不同条件下各细胞组分粗脂肪酶的活性变化。研究发现, 施氏假单胞菌的细胞质、细胞膜和细胞壁均含有合成反应活性的脂肪酶, 且各合成活性在全细胞中所占的比例分别为 47.25%、22.70%和 30.05%。各细胞组分脂肪酶催化反应平衡时间高于全细胞催化反应平衡时间。当培养时间为 48 h 和以大豆油为诱导剂时, 各细胞组分的脂肪酶获得最大的合成活性。根据上述研究结果, 建立了具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中的生产模型。本研究对深入揭示以施氏假单胞菌为代表的全细胞催化剂的催化机理, 促进高效全细胞生物催化剂的研发和应用均具有重要的参考意义。

**关键词:** 施氏假单胞菌; 酶定位; 脂肪酶; 合成活性

文章篇号: 1673-9078(2017)7-36-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.006

## Study of the Synthetic Activity of Lipase from Different Cell Components in *Pseudomonas stutzeri*

XIN Xuan, LI Xiao-feng, TANG Yu-qian

(School of Food Sciences and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Using *Pseudomonas stutzeri* cells with synthetic activity, the crude lipases in different cell components were separated and obtained by ultrasonic destruction-solvent extraction, and the changes in the activities of lipases in different cell components under different conditions were determined. The results showed that the lipases with synthetic activity were localized in the cytoplasm, cell membrane, and cell wall of *P. stutzeri* cells, and the proportions of the corresponding synthetic activities in the whole cell were 47.25%, 22.70%, and 30.05%, respectively. The equilibrium time of the transesterification reaction catalyzed by lipases in the different components was higher than that for whole-cell catalysis. The lipases from different components showed the highest synthetic activity when the culture time was 48 h and soybean oil was used as the inducer. Based on the above study results, a production model of lipases in *P. stutzeri* cells was established. These results provide an important reference revealing the catalytic mechanism of whole-cell catalysis using *P. stutzeri* as a representative organism, and could promote the development and application of high-efficiency whole-cell biocatalysts.

**Key words:** *Pseudomonas stutzeri*; enzyme localization; lipase; synthetic activity

微生物脂肪酶 (Lipase, EC.3.1.1.3), 即三酰基甘油酯水解酶, 可催化天然底物油脂水解生成脂肪酸、甘油和甘油二酯或者单酯, 而在非水介质中则催化该反应的逆反应<sup>[1,2]</sup>。因此, 微生物脂肪酶的水解活力和合成活力是表征微生物脂肪酶特性的两个重要参数, 其中最常用的活性表征是脂肪酶的水解活性。通常,

收稿日期: 2017-05-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270636、21676105); 中央高校基本业务费项目 (2015ZZ111)

作者简介: 辛璇 (1991-), 女, 硕士研究生, 硕士在读, 研究方向: 生物催化

通讯作者: 李晓凤 (1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 生物催化

脂肪酶在水相中表现出较高的水解活性而在非水相中则表现出较高的合成活性<sup>[3]</sup>。虽然以水解活性和合成活性为标准的微生物脂肪酶的研究均有报道, 但具有合成活性的脂肪酶的全细胞催化研究还很少报道。

全细胞催化 (Whole-cell biocatalysis) 属于生物催化技术的一种, 是指利用完整的微生物全细胞作为催化剂进行化学转化的过程。与游离酶催化相比, 全细胞催化法避免了繁琐的酶分离纯化步骤和辅因子再生等问题, 从而提高生物催化效率和降低生产成本, 无疑具有工业化应用潜力。在全细胞催化的合成反应中, 起实质催化作用的是微生物细胞中的脂肪酶。微生物脂肪酶按照在细胞中的不同位置可以分为胞外脂肪

酶、胞内脂肪酶和胞连接脂肪酶。由于微生物来源的脂肪酶一般属于胞外酶,所以胞外脂肪酶一直是研究的热点,同时也是工业应用酶制剂的重要来源<sup>[4-6]</sup>。胞内脂肪酶是指存在于细胞质中的脂肪酶,有研究报道表明,胞内脂肪酶的生成量很少且不及胞连接脂肪酶稳定性好,所以一直很少被研究报道<sup>[7,8]</sup>。而胞连接脂肪酶是指连接在细胞壁、细胞膜以及周质空间中的脂肪酶,胞连接脂肪酶被认为是在全细胞催化中起主要催化作用的酶<sup>[9,10]</sup>。因此,酶在细胞中的分布、酶的表达水平以及在全细胞中各组分的酶所起的作用对其稳定性和催化效率都有极大的影响,而且新酶的催化特性的研究以及工业化提取目标酶均需要酶在细胞中定位的信息。

然而,迄今为止尚未见具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中定位的相关报道<sup>[11]</sup>。本研究在上述研究的基础上,首次对具有合成活性的施氏假单胞菌脂肪酶进行细胞定位及非水相中不同条件对其催化活性影响的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*), 华南理工大学食品安全与检测中心保藏菌种。

黄酮类化合物、丙酸乙酯 (VP), 购自日本 TCI 公司; 甲醇, 色谱级, 购自德国 Merck 公司; 营养肉汤培养基、酵母浸膏, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 吡啶, 江苏强盛化工有限公司, 分析纯; 异辛烷, 广州化学试剂厂, 分析纯; 大豆油、橄榄油, 购自沃尔玛超市; Tris-HCl, 购自上海缘聚生物技术有限公司; Triton X-100, 购自美国 Sigma 公司; 硫酸铵、磷酸氢二钾、硫酸镁、葡萄糖、吐温 20、吐温 60、吐温 80、司班 60 以及司班 80 均为市售分析纯。

### 1.2 主要仪器设备

waster 高效液相色谱仪, 配备 600 控制器、2996 光电二极管阵列检测器、717 Plus 自动进样器。色谱柱: 4.6×250 mm (5 μm) Zorbax SB-C18 分析型色谱柱 (Agilent Technologies Co, Ltd, USA); 全温摇瓶柜: HYG-A 太仓市实验设备厂; 超净工作台: SW-CF-IF 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 真空冷冻干燥机: logJ-10D, 北京四环科学仪器厂有限公司; TW-3021HR 冷冻离心机, 安徽嘉文仪器装备有限公司; 高速离心机, Thermos; YXQ-LX 立式压力蒸汽灭菌锅; HZQ-F100 全温气浴振荡培养箱; PHSJ-4A 型实验室

pH 计: 上海精密科学仪器有限公司; 移液枪 (20 μL、100 μL、200 μL、1 mL 和 5 mL); 德国 Eppendorf; FA2204B 电子天秤: 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 菌种的培养及全细胞催化剂的制备

细菌种子液培养基: 营养肉汤培养基。

细菌发酵液: 5.0 g/L (*m/V*) 硫酸铵, 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 0.2 g/L 硫酸镁, 5.0 g/L 酵母浸膏, 5.0 g/L 大豆油。

从试管斜面接 1-2 环菌种到细菌种子液培养基中, 在恒温气浴摇床 (37 °C, 180 r/min) 中培养 24 h, 活化后按 2% 的接种量 (*V/V*) 接种到细菌发酵液中, 37 °C、180 r/min, 摇瓶培养 48 h。然后 10000 r/min 离心 5 min 后, 弃去上清液, 收集湿菌体, 最后用蒸馏水清洗三遍以除去残留在菌体表面的培养基。-20 °C 预冻过夜后真空冷冻干燥 24 h 获得冻干的菌体, 碾磨成粉即可得到全细胞催化剂, 并在 4 °C 冰箱中密封储存备用。

#### 1.3.2 不同细胞组分脂肪酶的制备

将冻干菌粉 [1% (*m/V*)] 均匀分散到 20 mM Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.5) 中, 然后在冰水浴下进行超声破碎 (500 W, 工作 2 s, 停 2 s, 共 8 min) 处理, 利用环境扫描电镜 (Scanning Electron Microscope, SEM) 观察超声破碎后的效果<sup>[7]</sup>。细胞破碎后, 胞内的粗酶蛋白经轻微的搅拌充分溶解到 Tris-HCl 缓冲溶液中, 然后将细胞破碎液在 4 °C、15000 r/min 下离心 10 min, 收集含有胞内酶蛋白的上清液, 进行真空冷冻干燥后获得的冻干粉即为细胞质组分<sup>[7,12]</sup>。将离心后的沉淀均匀溶解到含有 1% (*m/V*) Triton X-100 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 并轻微的搅拌, 在 25 °C 中振荡 5 h 以充分将膜连接酶释放到缓冲液中<sup>[13]</sup>。Triton X-100 是一种非离子型表面活性剂, 它能结合并溶解脂质, 主要作用于内膜的磷脂双分子层释放细胞膜连接酶到 Tris-HCl 缓冲溶液中。在 4 °C、15000 r/min 下离心 10 min, 收集的上清液, 进行真空冷冻干燥后获得的冻干粉即为细胞膜组分。最后将离心后的沉淀溶解到 20 mM Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.5) 中, 搅拌均匀, 冷冻干燥后获得的冻干粉即为细胞壁组分<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.3 全细胞及其各细胞组分合成反应活性的表征

根据前期的研究, 选择以下最优的反应条件<sup>[15]</sup>: 在 10 mL 带塞三角瓶中加入 1.0 mL 吡啶-异辛烷 [1:1 (*V/V*)], 30 mM 黄酮类化合物、600 mM 丙酸乙酯, 混合均匀。加入 40 mg 全细胞及其各细胞组分催化剂

开始反应,置于气浴恒温摇床上振荡(40℃, 180 r/min)。以不加催化剂为空白组。定时取样 100 μL, 15000 r/min 离心 5 min 后取 20 μL 上清液,用 60% 甲醇-水溶液稀释 50 倍,液相色谱自动进样器吸上清液 20 μL,供分析。

#### (1) 反应初速度的计算

根据反应初始阶段单位时间内产物的生成量来计算初始反应速度:

$$\text{反应初速度 } V_0 (\text{mmol/L}\cdot\text{h}) = P_t/t$$

式中,  $P_t$  为反应后产物的浓度, mmol/L;  $t$  为反应时间, h。

#### (2) 产率 Yield (%)

根据反应后产物的生成量来计算产率:

$$\text{产率 } Y(\%) = [P_t/S_0] \times 100\%$$

式中,  $P_t$  表示反应后产物的浓度, mmol/L;  $S_0$  表示底物黄酮类化合物的初始摩尔浓度, mmol/L。

### 1.3.4 高效液相色谱(HPLC)分析

仪器: Waters 高效液相色谱仪; 配备 PDA 紫外检测器; 检测波长为 336 nm。色谱柱: 4.6×250 mm, 5 μm Zorbax SB-C18 分析型色谱柱。分析条件: 60% 甲醇-水溶液(含 0.1% 乙酸); 流速: 0.9 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL; 底物和产物酯的保留时间分别为 3.3 min 和 4.5 min。

### 1.3.5 蛋白酶活力的测定

按照改良的 Rahman R N<sup>[16]</sup> 的蛋白酶活性测定的方法,测定施氏假单胞菌发酵液、细胞质、细胞膜和细胞壁中的蛋白酶的活力。将稀释后的酶液(1.0 mL)转移到 10 mL 的离心管中,在 37℃ 下预热 5 min。然后往预热后的酶液中加入 1.0 mL 的酪蛋白溶液(pH 7.5)在 37℃ 下开始反应,待反应 10 min 后,加入 2.0 mL、0.4 M 三氟乙酸溶液终止反应然后继续在 37℃ 下保温 20 min。反应所得到的混合溶液在 12000 r/min 下离心 10 min,取 1.0 mL 上清液,加入 5.0 mL、0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液和 1.0 mL 福林酚-水溶液[1:3 (V/V)]。振荡摇匀,在 37℃ 下保温发色 20 min,然后在 660 nm 波长测定吸光度值。设置空白对照组时其它步骤相同,只时在加入酶液后立即加入 2.0 mL、0.4 M 三氟乙酸溶液在 37℃ 保温 5 min<sup>[17]</sup>。1 单位(U)蛋白酶活性被定义为等同于 1 mL 酶液反应后释放出 0.5 μg 酪氨酸的量。利用酪氨酸标准曲线确定释放出的酪氨酸的量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 施氏假单胞菌不同细胞组分粗脂肪酶的

### 合成活性

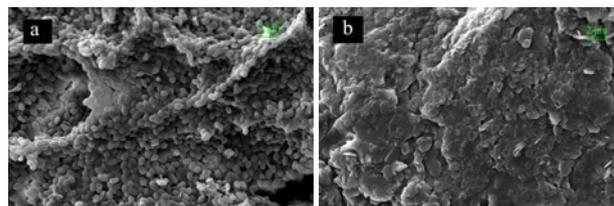


图1 破碎前(a)后(b)施氏假单胞菌的细胞形态的SEM分析  
Fig.1 SEM analysis of *P. stutzeri* cell morphology before (a) and after (b) destruction

细胞破碎是酶在细胞中定位的关键步骤,破碎方法的相关参数的选择会影响到细胞破碎率以及目标酶的酶活。如图1所示,这是利用环境扫描电镜对破碎前后细胞的表面形态进行分析。图1a显示的是培养48 h后施氏假单胞菌正常的细胞形态图,呈现短棒状。当细胞经过 500 W 的超声破碎处理后,可以清晰看到细胞碎片(图1b),说明超声波能完全破碎施氏假单胞菌并且破碎效果良好。

经超声波破碎后,用有机溶剂提取获得施氏假单胞菌不同细胞组分的粗脂肪酶。将各细胞组分的粗脂肪酶应用于黄酮类化合物和丙酸乙烯酯的催化反应中,其中以完整的全细胞催化剂作为对照组,以不加任何催化剂作为空白组。催化反应结果如表1所示,细胞质、细胞膜和细胞壁组分的粗脂肪酶均显示出具有催化黄酮酯合成的催化活性。在反应 24 h 时,以胞内脂肪酶作为催化剂时催化黄酮酯合成获得最快的初速度(0.88 mM/h)以及最高的产率(16.0%),其次是以细胞壁和细胞膜组分中的粗脂肪酶作为催化剂时。当全细胞催化剂作为对照组时,结果显示全细胞的催化活性和催化效率远远高于细胞各组分的粗脂肪酶,这表明经细胞破碎后全细胞中具有合成活性的脂肪酶部分失去活性或者在破碎处理过程中丢失。曾有研究报道,对天然连接在细胞结构上的酶进行提取可能会导致此类酶部分或者全部失去活性<sup>[18]</sup>。因此,酶活性的损失归因于胞内脂肪酶和胞连接脂肪酶经细胞破碎后失去了细胞结构的保护,使其对更容易在反应体系中降解<sup>[19]</sup>。确实,细胞膜的天然保护屏障作用在全细胞催化中是非常重要的一个方面<sup>[20]</sup>。这也解释了胞内脂肪酶和胞连接脂肪酶比游离酶在有机溶剂、高温或者极端 pH 体系中更稳定的原因<sup>[21]</sup>。

根据表1建立图2,图2a指的是短棒状施氏假单胞菌的剖面图,显示了具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中的分布,绿色区域以及红线分别指的是细胞壁连接脂肪酶和细胞膜连接脂肪酶的分布区域,而

蓝色区域指的是胞内脂肪酶分布的区域。图 2b 描述了各细胞组分的脂肪酶的合成活性所占的比例, 结果显示胞内脂肪酶、细胞膜连接脂肪酶和细胞壁连接脂肪酶的合成活性在施氏假单胞菌全细胞中所占的比例分别为 47.3%、22.8%和 29.9%。由于施氏假单胞菌细胞被完全破坏, 从其中充分提取细胞内脂肪酶, 并且确保脂肪酶的精确定位。这表明胞内脂肪酶参与黄酮酯类化合物的合成并且在全细胞催化中起着重要的作用, 其次才是细胞连接脂肪酶。此前, 由于细胞内脂肪酶的含量少并且细胞连接脂肪酶优于细胞内脂肪酶等优点, 研究人员认为细胞结合脂肪酶在全细胞生物催化中起主要作用, 因此关于胞内脂肪酶的研究很少有报道<sup>[7,8]</sup>。

表 1 全细胞及不同细胞组分合成活性的比较<sup>a</sup>

Table 1 Comparison of the synthetic activities of different cell components and whole cells<sup>a</sup>

Catalysts	$V_0$ /[mmol/(L·h)]	Yield/%
None <sup>b</sup>	0	0
Intracellular lipase	0.88±0.03	16.0±0.84
Cell membrane-bound lipase	0.44±0.08	7.7±0.15
Cell wall-bound lipase	0.67±0.02	10.1±0.65
Whole cell <sup>c</sup>	13.35±0.24	92.5±1.28

注: <sup>a</sup>表示施氏假单胞菌经含大豆油培养 48 h, 反应时间为 24 h; <sup>b</sup>表示不加催化剂作为空白对照组; <sup>c</sup>表示以全细胞为对照组。

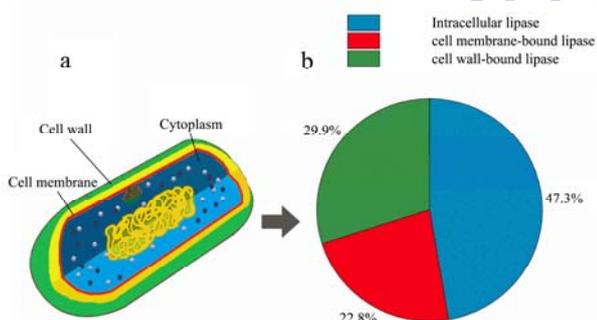


图 2 具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中的分布 (a) 和各组分脂肪酶的合成活性在全细胞中所占的比例 (b)

Fig.2 Distribution of lipases with synthetic activity (2a) and the proportion of the synthetic activity shown by lipases in the different cell components (2b) in the *P. stutzeri* cell

## 2.2 反应时间对不同细胞组分脂肪酶的合成活性的影响

如图 3 所示, 研究了来自不同细胞组分的脂肪酶的合成活性随着不同反应时间的变化。在起始反应阶段 (2 h), 各细胞组分的脂肪酶均显示出合成活性。

随着反应时间的增加, 由各细胞组分脂肪酶催化所得的黄酮酯的产率均持续增加。当全细胞作为催化剂时, 产物产率在反应 24 h 就达到 92.5%, 此后随着反应时间的增加并无明显的增加。然而, 以不同细胞组分的脂肪酶作为催化剂时, 在反应 36 h 到 48 h 时产率仍然略有增加。即对全细胞催化黄酮酯合成反应来说 24 h 就达到了反应平衡。有趣的是, 胞内酶和胞连接脂肪酶从全细胞中剥落不仅造成合成活性的损失也改变了生物反应达到平衡所需的时间。这种影响可能是由于酶从其天然细胞位置剥落后损失, 有效酶分子的量急剧减少, 因此在相同的反应时间下, 形成酶-底物复合物的数量少于由全细胞催化时的数量, 导致产物产率随着时间的增加而持续增加。总的来说, 经比较, 由胞内脂肪酶催化所得的产率高于其他组分催化所得的产率。

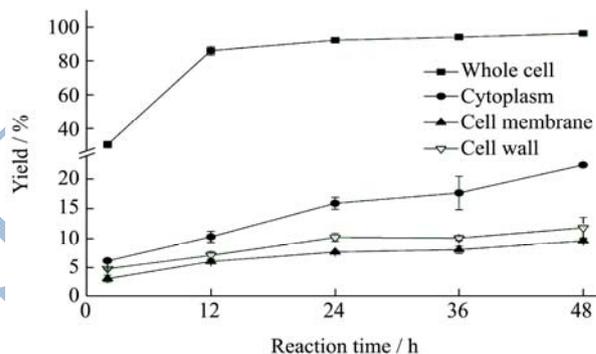


图 3 反应时间对不同细胞组分脂肪酶的合成活性的影响

Fig.3 Effect of reaction time on the synthetic activity of lipases from different cell components

## 2.3 培养时间对不同组分脂肪酶的合成活性的影响

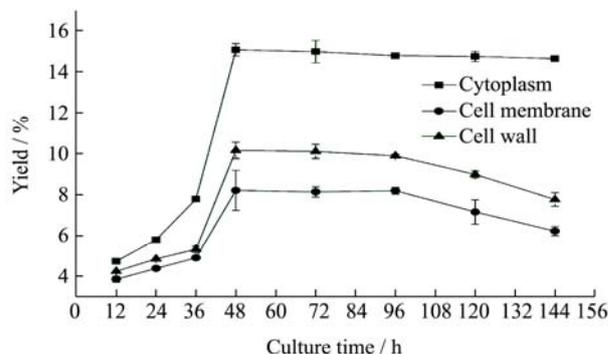


图 4 培养时间对各组分脂肪酶的合成活性影响对比

Fig.4 Effects of culture time on the synthetic activity of lipases from different components

如图 4 所示, 研究了各细胞组分粗脂肪酶随着不同培养时间其合成活性的变化。随着培养时间的延长,

三种组分的脂肪酶催化所得的产物产率的变化相似。在初始培养阶段（12 h）各细胞组分的脂肪酶的合成活性均被检测。直到培养时间 48 h 时，各细胞组分脂肪酶的合成活性均随着培养时间的增加而增加，而且在培养时间 36~48 h 时，产物产率有明显的增加。当施氏假单胞菌的培养时间超过 48 h 时，各细胞组分的脂肪酶催化所得的产率开始下降。然而，由细胞连接脂肪酶催化所得的产率下降得比胞内脂肪酶催化所得的产率更加显著。从研究结果表明，在三种细胞组分的脂肪酶催化反应中，胞内脂肪酶显示的合成活性最高，其次是细胞壁连接脂肪酶和细胞膜连接脂肪酶。总的来说，所观察到的脂肪酶的催化活性与其生物合成呈正相关。因此，48 h 是对于施氏假单胞菌产生胞内脂肪酶和胞连接脂肪酶的最适培养时间。

### 2.4 培养时间对不同组分蛋白酶的水解活性的影响

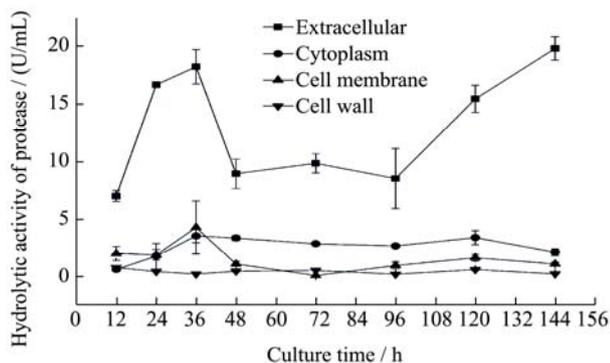


图 5 培养时间对不同组分蛋白酶的水解活性的影响

Fig.5 Effect of culture time on the hydrolytic activity of proteases from different components

蛋白酶是微生物细胞中重要的水解酶，对于细胞内包括脂肪酶在内的其它种类酶蛋白的表达水平影响较大，所以监测细胞各组分中蛋白酶的水解活性随着培养时间的变化能够为脂肪酶的合成活性的变化提供解析的依据。如图 5 显示了在不同培养时间下发酵液、细胞质、细胞膜和细胞壁中蛋白酶的活性的比较。在各细胞组分中的蛋白酶的水解活性比较低，这是因为大多数的蛋白酶是外分泌酶，如在发酵液中观察到的高蛋白酶活性所证实。在初始阶段（0~36 h）以及后期阶段（96~144 h），发酵液中蛋白酶的水解活性都非常高。虽然在培养时间 36 h 之前蛋白酶可能会水解脂肪酶使其降解，但是由于脂肪酶在此阶段大量的产生导致脂肪酶的含量仍然维持很高。在培养后期（96~144 h），蛋白酶的产生量增加而脂肪酶的产生量减少，导致细胞连接脂肪酶被蛋白酶水解，这解释了

在培养后期观察到的细胞连接脂肪酶的合成活性的降低。此外，发酵液中的蛋白酶的水解活性在培养 36~48 h 时显著下降然后在培养 48~96 h 时保持稳定。这与脂肪酶的合成活性一致，表现为脂肪酶的合成活性在相同的培养时间内先增加然后保持稳定。结合图 4 和 5，各细胞组分的脂肪酶的合成活性受培养期间多种因素的影响，其中包括阳性因素（脂肪酶的生物合成速率）和阴性因素（蛋白酶的生物合成速率）。

### 2.5 诱导剂种类对不同组分脂肪酶的合成活性的影响

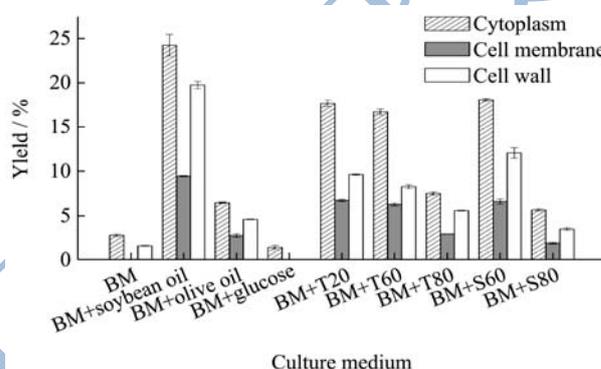


图 6 诱导剂种类对施氏假单胞菌不同细胞组分脂肪酶的合成活性的影响

Fig.6 Effect of different inducers on the synthetic activity of lipases in different components

前期研究发现，以不同碳源作为诱导剂对施氏假单胞菌催化黄酮酯合成反应的活性有着重要的影响<sup>[15]</sup>。然而，不同诱导剂对完整全细胞催化的活力的影响是通过对哪个细胞组分的脂肪酶的诱导合成影响尚未明确。有研究报道，诱导剂的添加不仅能诱导脂肪酶的产生，也可以作为一种补充碳源促进菌体的生长。如图 6 所示，研究了大豆油、橄榄油、葡萄糖、吐温 20、吐温 60、吐温 80、司班 60 和司班 80 等不同的诱导剂以及不添加诱导剂对施氏假单胞菌不同细胞组分脂肪酶合成活性的影响。研究结果表明，当向培养基添加植物油（大豆油和橄榄油）、Tween 系列化合物以及 Span 系列化合物时，施氏假单胞菌全细胞及其各细胞组分的脂肪酶的合成活性比未添加诱导剂时都有不同程度的提高，进一步表明具有合成活性的脂肪酶属于诱导酶类，需要添加诱导剂才能诱导其产生。然而添加了常规碳源葡萄糖后培养的施氏假单胞菌全细胞检测到的合成活性比未添加诱导剂时培养的还要低，这可能是葡萄糖的加入对脂肪酶的合成具有阻遏作用，导致脂肪酶的合成受阻，使得催化黄酮酯合成反应的活性降低。Peter<sup>[22]</sup>等研究发现过高浓度的葡萄糖

会导致微生物脂肪酶的合成下降,高浓度的葡萄糖会形成代谢阻遏现象,使得 mRNA 的转录受阻,从而导致了酶蛋白不能被翻译。如图 6 所示,上述诱导剂对施氏假单胞菌不同细胞组分脂肪酶的诱导效果的排序为:大豆油>司班 60>吐温 20>吐温 60>吐温 80>橄榄油>司班 80>葡萄糖。从研究结果看出,不同种类的诱导剂对胞内酶催化活性的影响最大,其次才是细胞壁连接脂肪酶和细胞膜连接脂肪酶,也就是进一步说明诱导胞内脂肪酶的产生对全细胞催化起着重要的作用。值得一提的是,有研究报道当各种油类或脂类物质作为诱导剂或碳源时,培养的微生物具有同时产生脂肪酶和生物表面活性剂(如脂多糖、糖酯和多糖藻

酸盐等)的能力<sup>[23]</sup>。这些生物表明活性剂能结合到细胞外膜,通过静电作用与脂肪酶相互作用,把分泌到发酵液中的脂肪酶保留在细胞表面形成细胞连接脂肪酶<sup>[24,25]</sup>。这也解析了为什么不同诱导剂诱导的胞内脂肪酶的合成活性高而其诱导产生的胞连接脂肪酶的合成活性也高。从施氏假单胞菌不同组分脂肪酶的催化效率来说,大豆油是培养施氏假单胞菌催化黄酮酯合成的最佳诱导剂。

## 2.6 具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中的生产模型

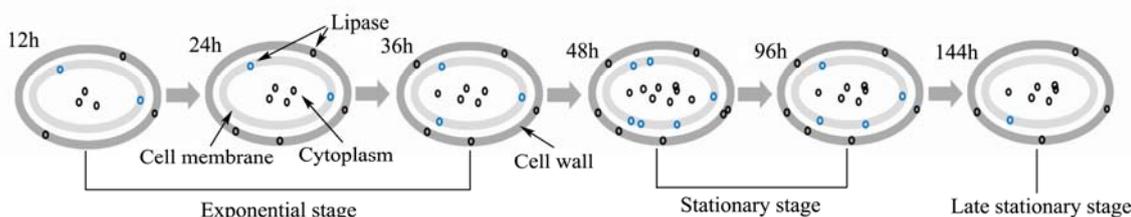


图 7 施氏假单胞菌中具有合成活性的脂肪酶的生产模型

Fig.7 Production model of lipase with synthetic activity in *P. stutzeri* cells

基于上述研究结果,建立一个具有合成活性的脂肪酶在施氏假单胞菌中动态生长的模型图如图 7 所示。在初始培养阶段(12 h),少量的脂肪酶产生。随着发酵的进行,营养物质不断被消耗以提供细胞生长和脂肪酶产生的能量。因此,细胞数目不断增多,胞内脂肪酶不断产生。但胞内脂肪酶并不是一直在细胞质中累积,而是会转移到细胞膜和细胞壁上,并分泌到培养基中。当培养时间为 48 h 时,各细胞组分的脂肪酶数量达到最大值。在生长稳定期(48~96 h),此时胞内的脂肪酶不断产生,部分分泌到胞外或是连接到细胞表面成为胞连接脂肪酶,各细胞组分的脂肪酶的数量维持稳定。在生长的后稳定期(96~120 h),碳源被消耗到低于细胞生长和酶生产所需的基本水平,细胞生长开始减慢。此阶段胞内酶的产生也受到了限制,含量稍微下降,但大部分的胞内酶保留在细胞中而不是分泌到发酵液中,这可能与能量限制的条件有关<sup>[26,27]</sup>。然而胞连接脂肪酶的数量急剧减少,这可能是因为发酵液中蛋白酶的含量增加水解了一部分胞连接脂肪酶分子。

施氏假单胞菌中具有合成活性的脂肪酶的生产模型与解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)细胞中脂肪酶的生产模型不同,该模型的胞内脂肪酶和胞连接脂肪酶均释放到培养基中,在发酵后期仅剩下基本水平的可溶性脂肪酶的存在<sup>[28]</sup>。Hooker<sup>[29]</sup>等研究证实了嗜麦芽假单胞菌(*Xanthomonas maltophila*)的脂肪酶的

合成与释放与菌体的物理状态有关,也表明了脂肪酶的生产在原核与真核细胞中有所不同。

## 3 结论

本研究首次对具有合成活性的施氏假单胞菌脂肪酶进行细胞定位及非水相中不同条件对其催化活性的影响进行研究。研究表明,具有合成活性的脂肪酶分布在施氏假单胞菌的细胞质、细胞膜和细胞壁中,且其合成活性在全细胞中所占的比例分别为 47.3%、22.8%和 29.9%。与全细胞催化相比较,各细胞组分脂肪酶催化反应平衡时间高于全细胞催化反应平衡时间,且各细胞组分的脂肪酶的合成活性远远低于全细胞催化剂的合成活性,这主要是对天然连接在细胞结构上的酶进行剥落会导致酶的活性降低甚至失去活性。各细胞组分的脂肪酶的合成活性受培养期间多种因素的影响,其中包括培养时间、诱导剂的种类和蛋白酶的生物合成速率。当培养时间为 48 h 和以大豆油为诱导剂时,各细胞组分的脂肪酶获得最大的合成活性。本研究对深入揭示以施氏假单胞菌为代表的全细胞催化剂的催化机理,促进高效全细胞生物催化剂的研发和应用均具有重要的参考意义。

## 参考文献

- [1] Reetz M T. Lipases as practical biocatalysts [J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2002, 6(2): 145-50

- [2] Cao S L, Huang Y M, Li X H, et al. Preparation and characterization of immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* onto magnetic cellulose nanocrystals [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 20420
- [3] Teng Y, Xu Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 99(9): 3900-3907
- [4] Deive F J, Carvalho E, Pastrana L, et al. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(14): 3630-3637
- [5] Hiol A, Jonzo M D, Rugani N, et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(5-6): 421-430
- [6] Salah R B, Mosbah H, Fendri A, et al. Biochemical and molecular characterization of a lipase produced by *Rhizopus oryzae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 260(2): 241-248
- [7] Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, et al. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalysts in biodiesel-fuel production [J]. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 2006, 101(4): 328-333
- [8] Wang D, Xu Y, Teng Y. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isoctane [J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2007, 30(3): 147-155
- [9] Razak C N A, Musani R, Basri M, et al. Characterization of membrane-bound lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* isolated from palm oil mill effluent [J]. *JAOCs*, 1999, 76(2): 171-174
- [10] Long K, Ghazali H M, Ariff A, et al. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* link: pattern and factors involved in its production [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1996, 67(2): 157-163
- [11] 赖学能, 李晓凤, 赵光磊. 秦皮甲素酰化反应中脂肪酶诱导剂对全细胞催化行为的影响及其产物结构鉴定[J]. 现代食品科技, 2015, 7: 37-43  
LAI Xue-neng, LI Xiao-feng, ZHAO Guang-lei. Effect of lipase induction on whole-cell biocatalyst behavior during esculin acylation and structural identification of products [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 7: 37-43
- [12] Tanino T, Matsumoto T, Fukuda H, et al. Construction of system for localization of target protein in yeast periplasm using invertase [J]. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 2004, 28(4): 259-264
- [13] Sun S Y, Xu Y. Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(3): 1336-1342
- [14] Iwashita K, Todoroki K, Kimura H, et al. Purification and characterization of extracellular and cell wall bound beta-glucosidases from *Aspergillus kawachii* [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1998, 62(10): 1938-1946
- [15] 赖学能. 秦皮甲素/柚皮苷的全细胞催化酰化反应研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015  
LAI Xue-neng. Whole cell mediated acylation of esculin and naringin [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [16] Rahman R N, Geok L P, Basri M, et al. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(4): 429-36
- [17] Keay L, Wildi B S. Proteases of the genus *Bacillus*. I. Neutral proteases [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 1970, 12(2): 179-212
- [18] Duetz W A, van Beilen J B, Witholt B. Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12(4): 419
- [19] Li X F, Zhu Z, Zhao G L, et al. A novel biocatalytic approach to acetylation of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosine by *Aspergillus oryzae*, whole cell in organic solvents [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 143-150
- [20] Schmid A, Dordick J S, Hauer B, et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow [J]. *Nature*, 2001, 409(6817): 258
- [21] Carballeira J D, Quezada M A, Hoyos P, et al. Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions [J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6): 686-714
- [22] Alston M J, Freedman R B. The water-dependence of the catalytic activity of bilirubin oxidase suspensions in low-water systems [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77(6): 651-657
- [23] Shu Z, Lin H, Shi S, et al. Cell-bound lipases from *Burkholderia* sp. ZYB002: gene sequence analysis, expression, enzymatic characterization, and 3D structural

- model [J]. BMC Biotechnology, 2016, 16(1): 1-13
- [24] Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, et al. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Microbiology, 2013, 13(1): 1-12
- [25] 张猛猛,黄敏,吴晓英,等.甜菜碱对 db/db 小鼠糖尿病肾病损伤的作用[J].现代食品科技,2014,30(5):23-27  
ZHANG Meng-meng, HUANG Min, WU Xiao-ying, et al. Effects of betaine on diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(5): 23-27
- [26] 张猛猛,田冰洁,洪秀云,等.纯化的绞股蓝皂苷的抗氧化活性研究[J].生物技术,2013, 23(1):76-78  
ZHANG Meng-meng, TIAN Bing-jie, Hong Xiu-yun, et al. Antioxidative activity of gypenosides purified [J]. Biotechnology, 2013, 23(1): 76-78
- [27] Gordillo M A, Obradors N, Montesinos J L, et al. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 43(1): 38-41
- [28] Mhm P M F L, Jr S A G. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(1): 71-75
- [29] Kumano H, Sasaki T, Soyama H. Is induction of the exocellular lipase of *Xanthomonas maltophilia* NK7 by fats and detergents simply the result of continual detachment from the cell surface? [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1997, 13(6): 677-681