

假丝酵母 99-125 脂肪酶的发酵工艺研究

何耀强 王炳武 谭天伟*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘 要 对假丝酵母 99-125 脂肪酶的发酵工艺条件进行了一系列研究。选择了合适的培养基成分并进行优化, 获得了最优的摇瓶培养基配方(% , W/V): 豆油 4.0, 全脂豆粉 4.0, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1。产酶水平能达到 5000 IU/mL。在 30L 发酵罐上进行初步放大实验, 其产酶水平能达到 8100 IU/mL。在 1m³ 发酵罐上进行中试放大, 产酶水平可达到 8000 IU/mL。

关键词 脂肪酶, 假丝酵母, 发酵

中图分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0918-04

脂肪酶(Lipase, E C 3.1.1.3, 甘油酯水解酶)是分解脂肪的酶, 专门在异相系统或水不溶系统的油(脂)水界面上水解酯^[1]。自 20 世纪 80 年代后期, 界面酶学和非水酶学的研究和应用取得了突破性的进展, 促进了脂肪酶多功能催化作用的应用。研究表明脂肪酶能在有机溶剂中催化酯合、酯交换等一系列反应, 因而在食品、皮革、造纸、有机合成、油脂化工工业, 以及洗涤剂、化妆品、医疗医药等方面具有应用和潜在的应用前景^[2]。脂肪酶的来源非常广泛, 在许多动植物及微生物中均存在。而微生物脂肪酶由于种类多、易于大量生产及提纯等优点, 是工业用脂肪酶的重要来源, 常见的包括假丝酵母^[3,4]、根霉^[5]、青霉^[6]和假单胞菌^[7]等产生的脂肪酶, 其中假丝酵母(*Candida* sp.)是国内外研究较多的产脂肪酶菌种。我们实验室获得了一株高产酶的菌株 *Candida* sp 99-125, 对其产酶工艺条件进行了研究和优化, 并在此基础上进行了小试和中试放大实验。

1 材料与方法

1.1 菌种

假丝酵母(*Candida* sp. 99-125), 本实验室选育保存。

1.2 培养基

1) 斜面培养基(% , W/V): 酵母粉 0.2, 蛋白胨 0.5, 葡萄糖 1.0, 琼脂 2.0。

2) 摇瓶培养基(% , W/V): 豆油 4.0, 全脂豆粉 4.0, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1。

3) 放大培养基(% , W/V): 豆油 6.0, 全脂豆粉 6.0, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1。加入适量消泡剂。

1.3 发酵条件

1.3.1 摇瓶培养: 250 mL 的锥形瓶中装摇瓶培养基 50 mL, 从斜面上接种一环种子, 放置于旋转式摇床上在 26℃ 下培养 120 h, 摇床转速 220 r/min。

1.3.2 30 L 发酵罐培养: 将发酵培养基(按 18 L 装液量)配好并装入发酵罐内, 121℃ 下灭菌 30 min, 冷却至 26℃ 后接种 1 个茄型瓶种子(用无菌水将菌种刮下), 搅拌转速 500 r/min, 通风量 1 VVM。

1.3.3 1 m³ 发酵罐培养: 将放大发酵培养基(按 60% 装液量)配好并装入罐内, 121℃ 下灭菌 30 min, 冷却至 26℃ 后接种 3 个茄型瓶种子(用无菌水将菌种刮下), 搅拌转速 200 r/min, 通风量 1 VVM。

1.4 脂肪酶活性的测定

采用橄榄油乳化液测定法, 配制 2% (W/V) 的聚乙烯醇(PVA 1750)溶液, 与橄榄油按体积比 3:1

收稿日期: 2004-04-13, 修回日期: 2004-06-09。

基金项目: 国家十五攻关项目(No. 2001BA708B03-08), 国家 863 项目(No. 2002AA514030), 国家 973 项目(No. 2003CB716002), 国家自然科学基金项目(No. 20176002, No. 20306002, No. 20136020, No. 20325622, No. 50373003), 北京市自然科学基金(No. 20322013), 高校博士点基金(No. 2030010004)。

* 通讯作者。 Tel: 86-10-64416691; Fax: 86-10-64715443; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

混合后高速搅拌 3 min 制得橄榄油乳化液,取 5 mL 乳化液与 4 mL 磷酸缓冲液(0.1mol/L, pH 8.0)混合,在 40℃ 水浴中预热 5 min,加入样液反应 10 min 后加入 15 mL 无水乙醇终止反应,以酚酞作指示剂,用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴至液体呈粉红色。与空白样对比计算其酶活。在测定条件下,每分钟释放出 1 μ mol 脂肪酸的酶量定义为 1 个酶活单位(IU)。

2 实验结果与讨论

2.1 氮源的影响

以葡萄糖作碳源,比较了不同的氮源对脂肪酶产量的影响,结果见表 1。从表中可以看出,全脂豆粉发酵水平较高,而且来源容易,因此选其作为发酵培养基的氮源物质。

表 1 不同氮源下产酶水平的比较

Table 1 Effects of nitrogen sources on lipase production

Nitrogen source	Beef peptone	Yeast extract	Soy powder	Corn powder	Cottonseed protein	Com protein powder
Lipase activity/(IU/mL)	1490	1106	1522	1.813	0.49	0

(W/V) 3% Glucose, 4% nitrogen source, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 26℃, cultured in 250mL shake flask for 120h

2.2 碳源的影响

通常认为在培养基中添加油脂类可以诱导脂肪酶的产生,显著地增加脂肪酶产量。我们选择各种油脂作为碳源进行比较研究,结果比较见表 2。

表 2 不同碳源下产酶水平的比较

Table 2 Effects of carbon sources on lipase production

Carbon source	Rap oil	Soybean oil	Salad oil	Corn oil	Peanut oil	Palm oil	Olive oil
Lipase activity/(IU/mL)	5088	4326	4169	3228	3027	1237	1040

(W/V) 3% carbon source, 4% Soy powder, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 26℃, cultured in 250mL shake flask for 120h

在比较的各种油脂中,菜籽油产酶水平最高,而易于从市场大量购买的豆油的脂肪酶产量也具有较高水平,因此选用豆油作为发酵研究的碳源物质。我们比较了表 2 中各种油脂的脂肪酸含量,见表 3。发现产酶较高的菜籽油、豆油和色拉油的油酸含量都不高,而亚麻酸的含量都相对较高。因此亚麻酸可能起到了诱导促进菌体产酶的作用。这有助于进一步研究菌体的产酶机理。

2.3 混合碳源的影响

由于葡萄糖利于菌体吸收利用,促进生物量的

提高,而油脂类物质能诱导产酶,因此我们研究葡萄糖和豆油作混合碳源对产酶的影响。以总碳源浓度为 4%,选择了五种不同的配比(4%油、3%油 + 1%糖、2%油 + 2%葡萄糖、1%油 + 3%葡萄糖、4%葡萄糖),发酵曲线如图 1 所示,采用混合碳源并没有起到提高产酶水平的作用,因此在随后的实验中仍采用豆油作单一碳源。

2.4 发酵温度的影响

采用全脂豆粉、豆油、基本无机盐为摇瓶培养基成分,在旋转式摇床中,不同温度下培养 120h,结果见表 4。从表中可知,菌体产脂肪酶的适宜温度较窄,以 26℃ ~ 30℃ 最适,超过 30℃,脂肪酶产量明显减少,到 34℃ 脂肪酶较低。因此发酵温度控制在 26℃ 比较适宜。

2.5 起始 pH 的影响

培养基在接种前用 1mol/L NaOH 和 1mol/L HCl 将 pH 调节到一定值,26℃ 下培养 120h,结果见表 5。从表中可见,发酵初始 pH6 ~ 7 最利于生产脂肪酶,而发酵液的起始自然 pH 在 6 左右,因此在发酵中无需调节初始 pH。

表 3 实验中各种油脂的脂肪酸的相对含量

Table 3 Fatty acids in various oils

Relative content/%	Rap oil	Soybean oil	Salad oil	Corn oil	Peanut oil	Palm oil	Olive oil
Saturated fatty acid	6.8	13.7	16	13	17	47	14
Oleic acid	32	25	25	30	49	43	72
Linoleic acid	24	52	47	50	29	8	11
Linolenic acid	8	7	5	2	1	0	1

表 4 发酵温度对产酶的影响

Table 4 Effects of temperature on lipase production

T/℃	26	28	30	32	34
Lipase activity/(IU/mL)	4150	4200	3870	2000	1000

(W/V) 3% soybean oil, 4% Soy powder, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, cultured in 250mL shake flask for 120h

表 5 初始 pH 对产酶的影响

Table 5 Effects of initial pH on lipase production

Initial pH	4	5	6	7	8	9	自然
Final pH	4	4.8	5.6	6.4	6.7	7.2	6
Lipase activity/(IU/mL)	400	3460	3950	3600	2040	700	3820

(W/V) 3% soybean oil, 4% Soy powder, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% KH₂PO₄, 26℃, cultured in 250mL shake flask for 120h

2.6 摇瓶培养基的优化

通过选择合适的培养基成分,在较适培养条件下,采用正交试验对摇瓶培养基成分浓度进行优化,获得了最优的摇瓶培养基配方:(%, W/V) 豆油 4.0, 全脂豆粉 4.0, K_2HPO_4 0.1, KH_2PO_4 0.1。发酵酶活水平能达到 5000 IU/mL。在摇瓶发酵过程中,通过测定体系 pH 值的变化,发现在酶活达到最高值时 pH 为 4.3~4.5,判断最适产酶 pH 为 4.3。

2.7 30 L 发酵罐小试

在最优摇瓶培养基配方的基础上后,我们在 30 L 发酵罐中进行了初步的放大实验以研究其发酵产脂肪酶的效果,结果如图 2 和图 3 所示。

从图 2 看到,通过补加氨水控制 pH 不低于 4.3,最终发酵酶活单位能达到 7600 IU/mL,产酶水平高于摇瓶发酵。从发酵参数变化发现,随着菌体的生长和产脂肪酶分解油脂产生脂肪酸,体系的 pH 和溶氧水平同时开始剧烈下降,很快就分别降到 4.5% 和 3%。为了维持菌体正常代谢,采用增大搅拌的手段确保氧的传递,但是溶氧水平仍一直保持

在 1%~2% 的水平,同时加入氨水控制体系 pH 在 4.3。由于发酵液起沫严重造成培养基的损失,使发酵处于不正常状态,导致周期延长了 1 倍,因此对培养基成分和发酵条件作进一步的改进。

随后采取适当增大碳氮源特别是豆油的浓度并加入合适的消泡剂压制泡沫,和改进发酵工艺条件、改善通气搅拌效果等措施后,发酵体系起沫状况得到控制,产酶效果得到提高,至 165 h 发酵液酶活达到 8100 IU/mL,结果见图 3。但由于采用茄型瓶种子接种,接种量有限导致停滞期较长,约 40 h,需要对接种工艺作进一步的改进。

2.8 1 m³ 发酵罐中试

经过了实验室 30L 规模发酵罐的研究之后,我们进一步对脂肪酶的大罐发酵工艺进行了初步研究。中试发酵罐的规模为 1 m³,结果如图 4 和表 6 所示。从三批次的发酵稳定数据看,经过 140 h 左右的发酵,平均发酵酶活能达到 8000 IU/mL。由于中试过程仍采用茄型瓶接种,停滞期较长,在将来可通过采用种子罐,增大接种量等手段进行改善。

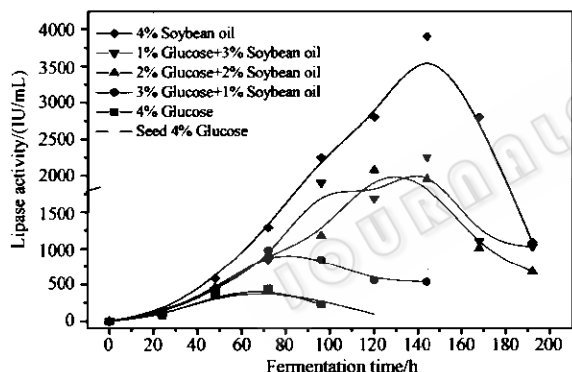


图 1 混合碳源发酵曲线

Fig.1 Fermentation results of mixed carbon source (W/V) 4% carbon source, 4% Soy powder, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 26°C, cultured in 250mL shake flask

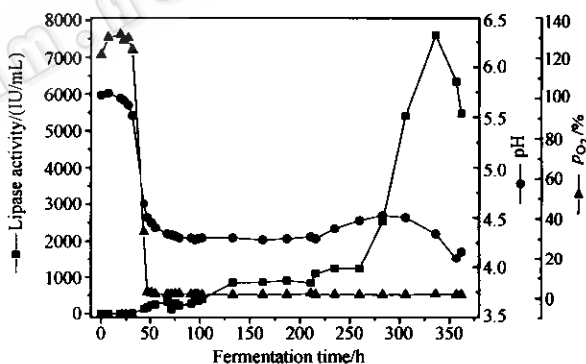


图 2 30L 发酵罐中发酵曲线

Fig.2 Fermentation results of 30L fermentor (W/V) 4% Soybean oil, 4% Soy powder, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 26°C

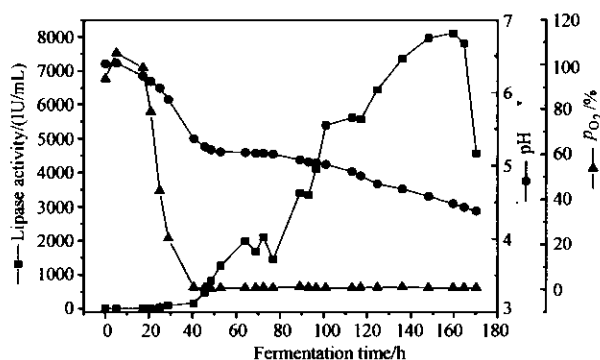


图 3 30L 发酵罐中发酵曲线

Fig.3 Fermentation results of 30L fermentor (W/V) 6% Soybean oil, 6% Soy powder, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 26°C

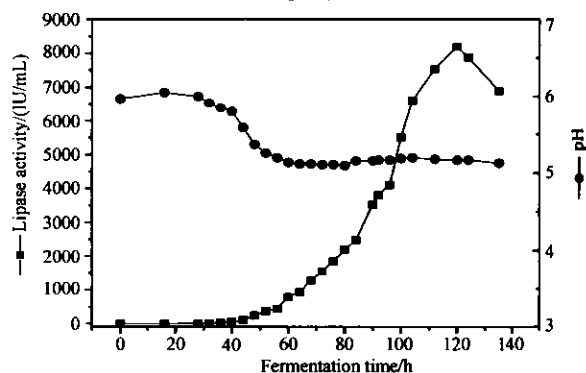


图 4 1 m³ 罐发酵曲线

Fig.4 Fermentation results of 1 m³ fermentor (W/V) 6% Soybean oil, 6% Soy powder, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 26°C

表 6 1m³ 发酵罐试验结果Table 6 Fermentation results of 1m³ fermentator in 3 batches

Number of batches	Lipase activity(IU/mL)
031024	7900
031104	7800
031117	8200

3 结 论

豆粕和豆油适合作为假丝酵母 99-125 发酵产脂肪酶培养基的氮碳源。最优摇瓶培养基配方为(% , W/V): 豆油 4.0, 全脂豆粉 4.0, K₂HPO₄ 0.1, KH₂PO₄ 0.1, 其产酶水平能达到 5000 IU/mL。通过小试和中试放大试验, 1m³ 发酵罐产酶水平可达到 8000 IU/mL。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zhang SZ (张树政). Enzyme Industry (酶制剂工业). 2nd ed. Beijing: Science Press (科学出版社), 1998

- [2] Sharma R, Chisti Y, Banerjee CU. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 2001, 19:627-662
- [3] Song QX (宋庆训), Lin JP (林金萍), Rong YP (戎一平) et al. Studies on lipase production from *Candida rugosa*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, 1(17):101-104
- [4] Montesinos L, Dalmau E, Casas C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2003, 78:753-761
- [5] ul-Haq I, Idrees S, Rajoka MI. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 2002, 37:637-641
- [6] Li JH (李江华), Wu MC (邬敏辰), Wu XZ (邬显章). Fermentation technology of alkaline lipase produced by *Penicillium cyclopium* PG37. *Journal of Wuxi University of Light Industry* (无锡轻工大学学报), 2000, 2 (19):100-104
- [7] Kanwar L, Gogoi KB, Goswami P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 2002, 84:207-211

Fermentation Production Technology of Lipase with *Candida* sp. 99-125

HE Yao-Qiang WANG Bing-Wu TAN Tian-Wei*

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical and Technology, Beijing 100029, China)

Abstract Lipase catalyses many ester synthesis and transesterification reaction. The lipase from *Candida* sp. has good esterification ability without positional specificity for triglycerides and has potential application in the synthesis of short chain esters as flavor compounds or biofuels such as biodiesel. The fermentation of lipase with *Candida* sp. 99-125 has been studied. The effects of different carbon resources and nitrogen resources on the lipase production were investigated. It was found that soybean oil and soy powder can enhance the lipase production. The optimal medium composition is 4% soybean oil, 4% soy powder, 0.1% K₂HPO₄ and 0.1% KH₂PO₄. The suitable shake flask fermentation conditions was identified and the lipase activity in shake flask reached 5000 IU/mL. The process was scaled up from a laboratory bioreactor (30L) to a pilot fermentor (1m³). The amount of lipase reached 8100 IU/mL in 30L fermentor and 8000 IU/mL in 1m³ fermentor.

Key words lipase, *Candida* sp., fermentation

Received: 04-13-2004

This work was supported by a grant from the Tenth Five-year Key Program of the State Science and Technology (No. 2001BA708B03-08); National "863" Project (No. 2002AA514030); National "973" Project (No. 2003CB716002); National Natural Science Foundation of China (No. 20176002, No. 20306002, No. 20136020, No. 20325622, No. 50373003); Beijing Natural Science Foundation (No. 2032013); Doctor Program of High Educational (No. 2030010004).

* Corresponding author. Tel:86-10-64416691; Fax:86-10-64715443; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn