

文章编号 :1009-038X(2000)02-0100-05

圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵工艺条件^①

李江华¹, 邬敏辰², 邬显章¹

(1. 无锡轻工大学中央研究所, 江苏无锡 214036; 2. 复旦大学生物化学系, 上海 200433)

摘要 :研究了圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵工艺条件,优化了 PG37 的摇瓶最适产酶条件. 其中,发酵培养基的组成为(g/dL):豆饼粉 3.0,玉米浆 3.0,磷酸氢二钾 1.0,硫酸镁 0.1,大豆磷脂 0.5,柠檬酸钠 0.05,花生油 0.2;发酵培养基起始 pH 7.5,发酵温度(29±1)℃,摇床转速 250 r/min,发酵周期 96 h,发酵期间于 36,54,72 h 分别流加 0.4 g/dL 花生油.在此条件下,PG37 的脂肪酶产率为2 060 μmol/(min·mL). PG37 在 25 L 的实验室小罐中的产酶水平为 1 900 μmol/(min·mL).

关键词 :碱性脂肪酶;圆弧青霉;发酵

中图分类号 :TQ925.6 **文献标识码** :A

Fermentation Technology of Alkaline Lipase Produced by *Penicillium cyclopium* PG37

LI Jiang-hua¹, WU Min-chen², WU Xian-zhang¹

(1. Central Research Institute, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract :The fermentation technology of alkaline lipase produced by *Penicillium cyclopium* PG37 was studied. The optimal cultural conditions for alkaline lipase production in shaking flask were as follows: medium consisted of 3.0 g/dL soybean meal, 3.0 g/dL corn steep liquor, 1.0 g/dL K₂HPO₄, 0.1 g/dL MgSO₄, 0.5 g/dL soybean lecithin, 0.05 g/dL sodium citrate and 0.2 g/dL peanut oil. The cultivation was carried out by rotary shake(250 r/min) at (29±1)℃ with initial pH 7.5 for 96 h, during which 0.4 g/dL peanut oil was fed at 36, 54, and 72 h respectively. With these conditions, the alkaline lipase yielded by PG37 was about 2 060 μmol/(min·mL). The yield of alkaline lipase in laboratory bioreactor(25 L) reached 1 900 μmol/(min·mL).

Key words : alkaline lipase; *Penicillium cyclopium*; fermentation

目前,脂肪酶主要采用微生物发酵法生产^[1,2],且一般都采用批次培养的工艺.在培养过程中,培养基的组成^[3-6]和培养条件^[7,8]以及流加批次培养工艺^[9,10]都对脂肪酶的产酶水平影响很大.研究中

① 收稿日期:1999-05-12;修订日期:1999-10-25.

基金项目:国家“八五”科技攻关项目资助课题(85-08-03-07).

作者简介:李江华(1966年4月生),男,江西九江人,工学硕士,助理研究员.
万方数据

采用常规诱变结合抗性突变株筛选技术选育出一株碱性脂肪酶的高产菌 PG37^[11]. 在此基础上从培养基组成、培养条件和流加等方面对 PG37 菌株的培养条件进行了优化 ,其脂肪酶的产率提高了 3.5 倍左右.

1 材料与方法

1.1 菌种

圆弧青霉白色突变株(*Penicillium cyclopium* var *album*)PG37 [见文献 11].

1.2 培养基

- 1) 斜面培养基 :土豆培养基^[11].
- 2) 液体种子培养基(g/dL):豆饼粉 3.0 ,玉米浆3.0 ,大豆磷脂 0.5 ,磷酸氢二钾 0.5 ,硫酸镁 0.3 ,豆油 1.0 ,pH 自然 ,98 kPa 下灭菌 30 min.
- 3) 发酵培养基(g/dL): 豆饼粉 3.0 ,玉米浆 3.0 ,磷酸氢二钾 1.0 ,硫酸镁 0.1 ,大豆磷脂 0.5 ,花生油 0.2 ,pH 7.5 ,98 kPa 下灭菌 30 min.

1.3 摇瓶发酵条件

250 mL 的三角瓶中装发酵培养基 25 mL ,接种一环孢子 ,于旋转式摇床上(29±1)℃培养 96 h ,摇床转速 250 r/min ,偏心距 4.5 cm.

1.4 三角瓶液体种子制备

500 mL 的三角瓶装 100 mL 种子培养基 ,121℃灭菌 30 min ,冷却后接种一环孢子于旋转摇床上培养 20~24 h ,培养温度(29±1)℃ ,摇床转速 250 r/min ,偏心距 4.5 cm.

1.5 25 L 容积发酵罐培养条件

将发酵培养基(按 15 L 配料)装入发酵罐 ,121℃灭菌 30 min ,冷至 30℃接种液体种子 ,接种量 10% ,培养时间 72 h ,培养温度(28±1)℃ ,搅拌转速 600 r/min ,通风量 1.0 L/(L·min) ,发酵过程中分别于 30 ,42 ,54 h 流加 0.4 g/dL 的花生油.

1.6 碱性脂肪酶活力的测定

参考文献 [11].

2 结 果

2.1 氮源的影响

培养基的氮源可以用有机氮源和无机氮源或两者混合使用. 用待试验的各种氮源取代对照培养基中的氮源进行试验 ,氮源按含氮量(质量分数) 0.2 0.3 0.4 的水平添加 ,结果见表 1.

由表 1 可见 ,有机氮源的发酵产酶水平明显高于无机氮源 ,而且无机氮源质量浓度越高对产酶越不利. 有机氮源又以玉米浆、豆饼粉和酵母膏较

好. 此外 ,单一氮源的发酵产酶水平明显低于对照试验 ,因此又试验了复合氮源对产酶的影响 ,结果见表 2. 结果表明 ,不同氮源的配比中以 5 g/dL 豆饼粉和 3 g/dL 玉米浆较好.

表 1 氮源对 PG37 产脂肪酶的影响

Tab.1 Effects of nitrogen sources on the lipase production by PG37

氮源	添加量/ (g/dL)	酶活/ (μmol/(min·mL))	终了 pH
豆饼粉	4.0	369	6.8
	6.0	439	6.2
	8.0	336	6.1
玉米浆	6.3	507	6.7
	9.5	359	6.3
	12.6	314	5.9
酵母膏	2.4	416	6.4
	3.6	296	6.8
	4.8	239	6.9
蛋白胨	2.0	302	6.7
	3.0	250	5.9
	4.0	222	5.9
硫酸铵	0.95	274	6.4
	1.4	249	6.8
	1.89	182	7.1
氯化铵	0.74	251	6.5
	1.1	228	6.7
	1.53	205	7.0
硝酸铵	0.59	143	6.5
	0.89	120	6.5
	1.18	97	6.5
硝酸钠	1.22	302	6.9
	1.82	268	7.3
	2.43	230	7.5
对照*		570	6.8

注 :对照培养基的组成为(g/dL):豆饼粉 2.0 ,玉米浆 5.0 , K₂HPO₄ 0.5 (NH₄)₂SO₄ 0.1 ,豆油 0.2 ,pH 自然.

表 2 复合氮源对 PG37 产酶的影响

Tab.2 Effects of compound nitrogen sources on the lipase production by PG37

豆饼粉 质量浓度 (g/dL)	玉米浆 质量浓度 (g/dL)	酵母膏 质量浓度 (g/dL)	硝酸钠 质量浓度 (g/dL)	酶活/ (μmol (min·mL))
1	3	2	0	435
3	3	2	0	523
5	3	2	0	433
5	2	2	0	439
5	4	2	0	401
5	3	0	0	576
5	3	1	0	497
5	3	0	0.1	387
对照*				543

注 :对照培养基的组成为(g/dL):豆饼粉 2.0 ,玉米浆 5.0 , K₂HPO₄ 0.5 (NH₄)₂SO₄ 0.1 ,豆油 0.2 ,pH 自然.

2.2 碳源的影响

分别以葡萄糖等 8 种易利用的碳源和豆油等 6 种植物油脂试验了碳源对产酶的影响 ,见表 3.

表 3 碳源对 PG37 产脂肪酶的影响

Tab.3 Effects of carbon sources on the lipase production by PG37

碳源	添加量/(g/dL)	酶活/($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)
葡萄糖	1.3	383
	1.83	247
	2.37	219
蔗糖	1.2	438
	1.67	319
	2.13	360
麦芽糖	1.27	554
	1.77	339
	2.27	319
乳糖	1.27	378
	1.77	317
	2.27	315
果糖	1.27	394
	1.77	329
	2.27	287
糊精	1.3	525
	1.67	327
	2.13	321
可溶性淀粉	1.13	511
	1.57	340
	2.03	372
山芋粉	1.61	452
	1.25	317
	2.85	319
豆油	0.4	616
	0.7	613
	1.2	439
菜籽油	0.4	160
	0.7	114
	1.2	74
橄榄油	0.4	587
	0.7	531
	1.2	447
棉籽油	0.4	126
	0.7	459
	1.2	657
花生油	0.4	698
	0.7	608
	1.2	483
糠油	0.4	513
	0.7	439
	1.2	414

较低质量浓度时对产酶几乎无影响 ,其余易利用碳源对 PG37 产酶均有明显的抑制作用 ,而且质量浓度越高抑制作用越明显 .植物油脂中只有菜籽油对 PG37 产酶有明显的抑制作用 ,豆油、橄榄油、花生油和糠油在低质量浓度时对产酶较有利 ,当质量浓度升高后则对脂肪酶的合成表现出一定的抑制作用 .值得注意的是棉籽油的影响 ,在 1.4 g/dL 和 2.2 g/dL 两个质量浓度下 ,发酵酶活相差 5 倍 .又在 1.5 ~3.0 g/dL 的质量浓度范围内选 5 个水平试验棉籽油的影响 ,结果表明 2.0~2.5 g/dL 浓度范围内发酵酶活最高为 660 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$.

由于花生油等在质量浓度较高时对脂肪酶的合成有一定的抑制作用 ,因此采用降低初始培养基中油脂质量浓度 ,在发酵过程中流加油的工艺有可能提高脂肪酶的产率 .选择花生油 ,将培养基中的初始质量浓度降至 0.2 g/dL ,以不同的流加方式进行试验 ,见表 4 ,结果证明这一措施非常有效 .采用较适的流加油工艺 ,发酵时间可延长至 96 h ,脂肪酶的产率也提高了 50 % 左右 .

表 4 流加花生油对 PG37 产酶的影响

Tab.4 Effects of peanut oil feeding on the lipase production by PG37

流加方式	发酵周期/h	发酵结束 pH	酶活/($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$)
24 42 60 , 78 h 各加 0.4 g/dL	96	6.7	746
30 42 54 66 h 各加 0.4 g/dL	96	6.9	869
30 48 66 h 各加 0.4 g/dL	96	6.9	920
36 48 60 72 h 各加 0.4 g/dL	96	7.0	980
36 54 72 h 各加 0.4 g/dL	96	7.1	1 100

2.3 表面活性剂对产酶的影响

由于表面活性剂能改变细胞膜的通透性和改善氧在气液界面的传递速度 ,因此在培养基中添加某些表面活性剂能提高酶的产率 .试验了吐温 40 等 8 种表面活性剂对 PG37 菌株产酶的影响 ,见表 5 .可以看出 ,磷脂对脂肪酶的合成有明显的促进作用 ,其中尤以卵磷脂最佳 .但考虑到成本和来源 ,所以选择了价格低廉、来源丰富的大豆磷脂 .

2.4 盐类对产酶的影响

在培养基中分别添加柠檬酸钠、琥珀酸钠、磷酸氢二钾和硫酸镁等盐类 ,结果见表 6 .在试验质量

结果表明,除了麦芽糖、糊精和可溶性淀粉在

浓度范围内 ,琥珀酸钠抑制脂肪酶的合成 ,而柠檬酸钠则能促进脂肪酶的合成 .

表 5 表面活性剂对 PG37 产酶的影响

Tab.5 Effects of surfactants on the lipase production by PG37

表面活性剂	添加量/(g/dL)	相对酶活/ %
吐温 40	0.50	109
	0.75	108
	1.00	105
吐温 60	0.50	114
	0.75	119
	1.00	121
吐温 80	0.50	119
	0.75	114
	1.00	115
卵磷脂	0.50	154
	0.75	159
	1.00	167
大豆磷脂	0.50	120
	0.75	123
	1.00	128
聚醚 330	0.50	103
	0.75	104
	1.00	106
司班 20	0.50	88
	0.75	82
	1.00	80
司班 80	0.50	112
	0.75	107
	1.00	102
对照		100

表 6 盐类对 PG37 产酶的影响

Tab.6 Effects of salts on the lipase production by PG37

柠檬酸钠 质量浓度/ (g/dL)	琥珀酸钠 质量浓度/ (g/dL)	磷酸氢二钾 质量浓度/ (g/dL)	硫酸镁 质量浓度/ (g/dL)	相对酶 活/ %
0.05	0	1.0	0.1	133
0.1	0	1.0	0.1	104
0	0.05	1.0	0.1	55
0	0.1	1.0	0.1	36
0	0	0.5	0.1	97
0	0	1.0	0.1	100
0	0	1.5	0.1	70
0	0	1.0	0.05	70
0	0	1.0	0.2	98.7

2.5 培养基起始 pH 对产酶的影响

在培养过程中 ,培养基的 pH 直接影响到酶的

产率 因此试验了培养基的初始 pH 对 PG37 菌株产酶的影响 ,见图 1. 结果表明 培养基的初始 pH 对脂肪酶的合成有较大的影响 ,培养基的初始 pH 以 7.5~8.5 较合适 .

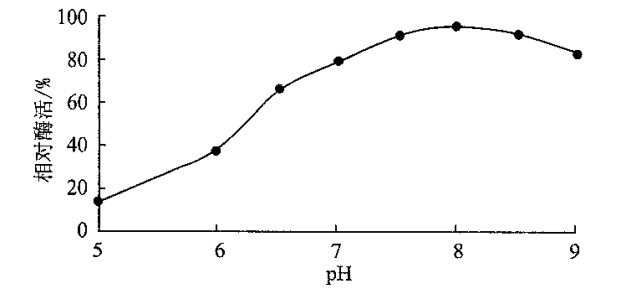


图 1 培养基起始 pH 对 PG37 产酶的影响

Fig.1 Effects of initial pH of the medium on the lipase production by PG37

2.6 溶氧对产酶的影响

好气微生物在发酵过程中必须提供大量的氧 以满足微生物生长繁殖和产酶的需要 .发酵液中溶氧浓度的高低直接关系到微生物产酶水平的高低 .从三角瓶装液量和摇床转速两个方面试验了溶氧对 PG37 产酶的影响 ,见图 2 ,3. 结果表明 ,较适的装液量为 250 mL 的三角瓶装 25 mL ,摇床转速为 250 r/min .

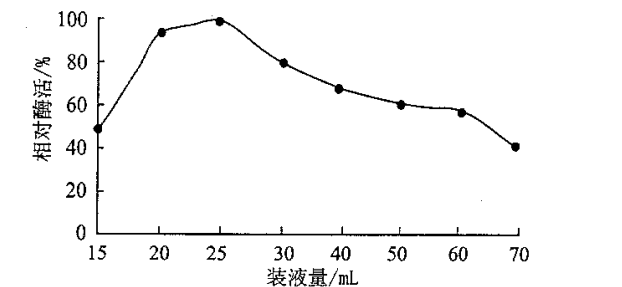


图 2 摇瓶装液量对 PG37 产酶的影响

Fig.2 Effects of medium volume in shaking flask on the lipase production by PG37

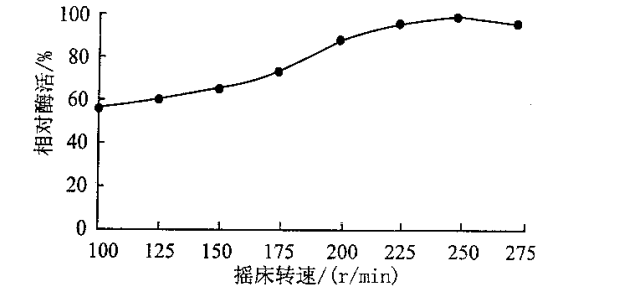


图 3 摇床转速对 PG37 产酶的影响

Fig.3 Effects of rotational speed on the lipase production by PG37

2.7 PG37 菌株最适产酶条件的确定

综合上述试验结果,选择豆饼粉、玉米浆、磷酸氢二钾、硫酸镁、柠檬酸钠、磷脂和培养基初始 pH 等 7 个因素,采用 $L_{16}(4^3 \times 2^6)$ 正交表作正交试验以确定 PG37 的最适产酶条件.根据正交试验的结果,确定了 PG37 菌株的最适产酶条件.发酵培养基(g/dL):豆饼粉 3.0,玉米浆 3.0,磷酸氢二钾 1.0,硫酸镁 0.1,大豆磷脂 0.5,豆油 0.2;发酵培养基起始 pH 7.5.发酵温度(29 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,摇床转速 250 r/min,发酵周期 96 h,期间于 36,54,72 h 分别流加 0.4 g/dL 花生油.在此条件下,PG37 的发酵过程曲线见图 4.

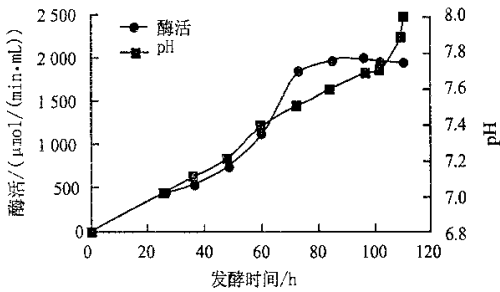


图 4 PG37 的摇瓶发酵过程曲线

Fig.4 Time course of cultivation of PG37 in a shaking flask

2.8 25 L 容积发酵罐的发酵结果

在上述条件下,在 25 L 的发酵罐中进行发酵试验,结果见图 5. PG37 在 25 L 容积的发酵罐中的发

酵产酶水平达 $1\,900\,\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$,而发酵周期比摇瓶的降低了 24 h.

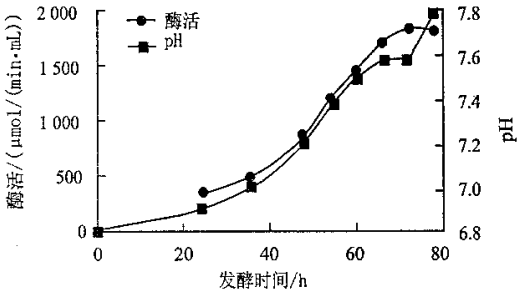


图 5 PG37 在 25 L 罐中的发酵过程曲线

Fig.5 Time course of cultivation of PG37 in a shaking stirred tank reactor

3 结 论

综合以上试验结果,确定了 PG37 菌株较适的摇瓶发酵条件.发酵培养基(g/dL):豆饼粉 3.0,玉米浆 3.0,磷酸氢二钾 1.0,硫酸镁 0.1,大豆磷脂 0.5,柠檬酸钠 0.05,花生油 0.2;发酵培养基起始 pH 7.5,发酵温度(29 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,摇床转速 250 r/min,发酵周期 96 h,发酵期间于 36,54,72 h 分别流加 0.4 g/dL 花生油.在此条件下,PG37 的脂肪酶产率为 $2\,060\,\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$.采用液体种子接种,PG37 在 25 L 的发酵罐中培养 72 h 的发酵产酶水平为 $1\,900\,\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mL})$.

参考文献

[1] MACRAE A. Microbial enzymes and biotechnology[M]. New York: Applied Science Pub, 1980.

[2] REZANKA T. Overproduction of microbial lipids and lipases[J]. Folia Microbiol, 1991, 36: 211~224

[3] WATANABE N, OTA Y, MINODA Y. isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes[J]. Agric Biol Chem, 1977, 41: 1353~1358

[4] YOSHITAKA K, HARUO M, SHINJIRO I. Studies on alkaline lipase: Isolation and identification of lipase producing microorganism[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46: 1159~1164

[5] TAN K H, GILL C O. Effects of culture conditions on batch growth of Pseudomonas fluorescens on olive oil[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1985, 23: 27~32

[6] ESPINOSA E, SANCHEZ S, FARRES A. Nutritional factors affecting lipase production by Rhizopus delemere CDBB H31[J]. Biotechnol Lett, 1990, 12: 204~209

[7] KOSUGI Y, KAMIBAYASHI A. Thermostable lipase from Pseudomonas sp. cultural conditions and properties of the crude enzyme[J]. J Ferment Technol, 1971, 49: 968~980

[8] GILBERT J E, DROZD J W, JONES C W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in Pseudomonas aeruginosa EF2[J]. J Gen Microbiol, 1991, 137: 2215~2221

[9] SUZUKI T, MUSHIGA Y, YAMANE T, et al. Massproduction of lipase by fed-batch culture of Pseudomonas fluorescens[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 27: 417~422

[10] CHARTRAIN M, MARCIN C, KATZ L, et al. Enhancement of lipase production during fed-batch cultivation of Pseudomonas aeruginosa MB 500[J]. J Ferment Bioeng, 1993, 76: 487~492

[11] 李江华, 鄢敏辰, 陶文沂等. 用筛选抗性突变株法选育碱性脂肪酶的高产菌[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18(3): 7~11

万方数据

(责任编辑:李春丽)