

文章编号:1673-1689(2009)02-0224-05

产脂肪酶菌 *Geotrichum candidum* NS3 的 固定化及其稳定性

段学辉, 欧阳军梅, 高鹤, 傅奇

(食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘要: 从南昌地区含油土样中, 筛选到一株脂肪酶产生菌白地霉(*Geotrichum candidum* NS3)。菌株摇瓶发酵的水解酶活为 321 U/g 干细胞, 合成酶活为 0.54 U/g 干细胞。以聚氨酯泡沫为载体对菌株 *Geotrichum candidum* NS3 进行固定化培养和稳定性研究, 结果显示, 聚氨酯泡沫颗粒尺寸 6 mm×6 mm×6 mm, 密度 27 kg/m³, 摇瓶培养 60 h, 有 73.8% 的细胞进入聚氨酯泡沫中生长固定, 载体固定细胞干重达到 2.32 g/g 载体。电镜图片显示白地霉(*Geotrichum candidum* NS3) 在载体孔隙内和脊壁上缠绕充盈, 生长良好, 固定结构稳定。固定化细胞颗粒连续 5 批次催化反应, 相对水解酶活保持率和固定细胞干重保持率分别达到 63.1% 和 71%, 具有良好的细胞固定稳定性和酶活保持率。

关键词: 脂肪酶; 地霉; 聚氨酯泡沫; 固定化

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Immobilization and Stability of Lipase-Producing Strain *Geotrichum candidum* NS3

DUAN Xue-hui, OUYANG Jun-mei, GAO He, FU Qi

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: A lipase-producing strain *Geotrichum candidum* NS3 has been isolated from Nanchang soil samples. The initial hydrolytic lipase activity and esterification synthetic lipase activity of the strain reached at 321 U/g dry cell and 0.54 U/g dry cell, respectively. The cell immobilization conditions of lipase-producing *Geotrichum candidum* NS3 with polyurethane foam (PUF) were investigated. With the optimal conditions: (PUF particle size 6 mm×6 mm×6 mm, density 27 kg/m³, immobilization culture time 60 h), 73.8% cells grown and immobilized in PUF carrier and the cells load of PUF particle reached 2.32 g/g. The pictures of scanning electric microscope (SEM) also showed that the mycelium *Geotrichum candidum* NS3 enlaced or filled in the hole inner and the wall of carrier (PUF). The colony configuration immobilized was stable. In the catalyze hydrolysis reaction, the remained rate of enzymatic activity reached 63.1%, and the loss rate of the immobilized cell less than 29% after five repeat batch reactions.

Key words: lipase, *Geotrichum candidum*, polyurethane foam, immobilize

收稿日期: 2009-02-01

基金项目: 江西省科技攻关项目(20041B0103000)。

作者简介: 段学辉(1958-), 男, 江西永新人, 工学博士, 教授, 主要从事食品生物技术方面的研究。Email: xhduan@ncu.edu.cn

随着世界经济的发展,能源需求日益加剧,生物柴油作为环境友好型能源,其研制和开发引起世界各国的关注。生物酶催化合成生物柴油具有反应条件温和、醇用量小、无污染物排放、产品回收方便等优点,使得生物酶法得到广泛的研究。优良的脂肪酶产生菌的选育^[1-2]对于生物柴油的开发具有重要作用。目前,酶法生产生物柴油的主要障碍是酶的成本太高,一个很有前景的解决方法是以全细胞生物催化剂的形式来利用脂肪酶。固定化细胞可免除酶的提取纯化,保持细胞的活力,进行连续催化反应,有利于提高生产能力和产物分离纯化效率,降低成本。Kazuhiro 等^[3]将丙酮干燥的脂肪酶产生菌米根霉 IFO4697 细胞固定在聚氨酯泡沫颗粒内,直接用来催化大豆油以生产生物柴油,甲酯化率达到 90%。Shinji Hama 等^[4]将产脂肪酶霉菌固定化细胞颗粒放入填充床中催化合成生物柴油,重复反应 10 批次后酯化率仍保持在 80% 左右。

作者从南昌地区含油土样中筛选到一株脂肪酶产生菌,考察了聚氨酯泡沫载体对菌体细胞的固定化能力,培养条件对载体固定细胞生物量和细胞酶活的影响,以及固定化细胞的稳定性和重复催化使用性能。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 土样 从南昌地区不同地点采集含油土样 30 份,自然风干,去杂,粉碎,过 40 目筛。

1.1.2 聚氨酯泡沫载体 市售聚氨酯泡沫,分别制成 10 mm×10 mm×10 mm、8 mm×8 mm×8 mm、6 mm×6 mm×6 mm、4 mm×4 mm×4 mm、2 mm×2 mm×2 mm 的立方体小块,沸水煮 30 min,浸在 5% HCl 溶液中 24 h,去离子水洗至中性,然后将其浸入 5% NaOH 溶液中 24 h,洗至中性,烘干备用。

1.1.3 培养基

1) 富集培养基(组分 g/dL): KH_2PO_4 0.3, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 0.05, 橄榄油 2。

2) 油脂同化平板培养基(组分 g/dL): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, K_2HPO_4 0.1, KCl 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, FeSO_4 0.001, 橄榄油乳化液 12, 琼脂 2, 溴甲酚紫 0.000 4, 0.8 kg/cm² 灭菌 30 min^[5]。

3) 斜面培养基: 麦芽汁斜面。

4) 复筛培养基(组分 g/dL): 蛋白胨 2, 蔗糖 0.5, 橄榄油 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, K_2HPO_4 0.1。

5) 液体种子培养基(组分 g/dL): 蛋白胨 2.5, 糊精 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, K_2HPO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, 大豆油 1.0^[6]。

6) 液体发酵培养基(组分 g/dL): 糊精 1, 蛋白胨 1, 酵母膏 1, 大豆油 1; pH 8.0^[6]。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选方法 取少量样品加入盛有富集培养基的试管中,30 ℃ 培养 5~7 d,连续富集 3 次。吸取 10 mL 富集培养液于 100 mL 无菌生理盐水中,梯度稀释至 10⁶ 倍浓度,取 10⁻⁴~10⁻⁶ 稀释液 0.1 mL 涂布于油脂同化平板上,30 ℃ 培养 3~4 d。挑取有黄色变色圈的菌落,经划线或无菌水梯度稀释平板培养获得单菌落,再挑单菌落至斜面培养基上保藏。挑取一环新鲜斜面种子于复筛培养基中,30 ℃、160 r/min 下培养 72 h,发酵液离心,取一定量细胞测酶活,根据酶活大小确定目标菌株。

1.2.2 细胞固定 将斜面菌种接种到 60 mL 液体种子培养基中,于 30 ℃、140 r/min 的条件下培养 32 h。然后按体积分数 12% 的接种量接入到 100 mL 加有聚氨酯泡沫颗粒的液体发酵培养基中,在 30 ℃、180 r/min 发酵 60 h,细胞进入或依附于聚氨酯泡沫内壁生长,将固定细胞的载体与发酵液过滤分离,生理盐水清洗 3 次,30 ℃ 风干,得到固定化细胞,4 ℃ 保藏待用。

1.2.3 固定化细胞酶催化反应稳定性考察方法

1) 水解酶活的稳定性考察:催化水解反应体系为 4 mL 桐籽油,8 mL 磷酸缓冲液(pH 7.0),固定化细胞一份,在 120 r/min 条件下,40 ℃ 水解 48 h 为一批次。连续进行 5 批水解反应,分别取样检测每批水解反应桐籽油的水解率和固定化细胞保留干重,考察固定化细胞的稳定性和水解酶活稳定性。

2) 合成酶活的稳定性考察:基本反应体系^[7]为 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 1.68 g 油酸和 0.33 mL 的甲醇(摩尔比为 1:1.4),5 mL 石油醚,固定化细胞一份,40 ℃ 密闭振荡反应 24 h。其中,甲醇分两次等摩尔添加。连续进行 5 批合成反应,分别取样检测每批样品的酯化率及固定化细胞保留干重,考察固定化细胞的稳定性和合成酶活稳定性。

酯化过程酯化率的测定:NaOH 滴定反应体系内酯化所减少的油酸的量,计算酯化率。

$$\text{酯化率} = \frac{\text{反应的油酸质量}}{\text{初始加入的油酸的质量}} \times 100\%$$

1.3 分析方法

1.3.1 细胞脂肪酶水解酶活力测定 NaOH 滴定

法测酶活^[8]。分别于空白瓶 A 和样品瓶 B 中各加 2% 橄榄油乳化液 4 mL 和 0.025 mol/L、pH 7.5 磷酸缓冲液 5 mL, 再于 A 瓶中加入 95% 乙醇 15 mL。置 40 °C 水浴内预热 5 min, 然后在两瓶中加入一定量细胞, 立即计时, 反应 15 min 后, 在 B 瓶中加入 95% 乙醇 15 mL 终止反应, 加酚酞指示剂 2 滴, 用 0.05 mol/L 标准 NaOH 滴定至微红色为终点。

水解酶活力定义: 40 °C 下, 油脂水解反应 15 min, 每分钟催化脂肪水解产生 1 μmol 脂肪酸的脂肪酶量定义为一个脂肪酶单位(U)。

1.3.2 细胞脂肪酶合成酶活力测定 脂肪酶的合成酶活力测定^[9]为 3 mL 合成酶活底物(1.35% 正丁酸, 2.7% 正丁醇, 85.95% 正庚烷), 加入一定量细胞, 在 40 °C 反应 2 h。加入 95% 乙醇 15 mL 终止反应。以酚酞为指示剂, 用 0.1 mol/L 标准 NaOH 滴定至微红为终点。同时以煮死失活细胞酶作空白对照。在测定条件下, 每分钟催化正丁酸和正丁醇合成产生丁酸丁酯, 从而减少 1 μmol 正丁酸的酶量定义为 1 个脂肪酶合成酶活力单位。

1.3.3 载体固定的生物量 载体固定的生物量测定采用干重法, 即将已知质量的固定化载体和固定在其内的细胞于 105 °C 烘干至恒重, 减去载体质量, 得到固定细胞干重。

1.3.4 扫描电镜样品制备 按文献^[10]方法进行扫描电镜样品制备。

1.3.5 水解率的测定 取水解物样品按酸值测定方法^[11-12]测定酸值, 水解率计算如下:

$$\text{水解率} = \frac{V_t - V_0}{S_v - A_v} \times 100\%$$

式中 V_t 、 V_0 分别为水解物样品在 t 时刻的酸值和初始酸值; S_v 、 A_v 分别为桐籽油的皂化值和初始酸值(折算为相同的底物量)。

2 结果与讨论

2.1 菌种筛选

从 30 份土样中分离筛选获得 53 株产酶菌株, 选取在平板上生长较快及透明圈较大的菌落, 经摇瓶复筛得到 5 株产酶能力较高的菌株。结果见表 1。其中菌株 NS3 脂肪酶水解酶活和合成酶活都相对较高。

菌株 NS3 的平板培养菌落形态和显微观察为白色菌落, 菌落呈绒毛状, 具有真菌丝, 菌丝易碎, 有二叉分枝, 裂殖。芽孢子单个或连接成链, 长筒状, 末端钝圆。根据对菌株的形态特征、培养特征及主要生理生化特性的初步研究, 确定 NS3 属地霉

属(*Geotrichum link*), 命名为 *Geotrichum candidum* NS3。

表 1 摇瓶结果

Tab. 1 Isolation results of lipase-producing microorganisms

菌株	水解酶活/(U/g)	合成酶活/(U/g)
NS3	321	0.54
NS18	148	0.11
NS20	304	0.23
NS41	113	0.38
NS49	259	0.09

2.2 载体性能对细胞固定化效果的影响

2.2.1 载体颗粒大小的影响 取不同大小的载体颗粒 0.2 g 分别加入到装有 100 mL 发酵培养基的摇瓶内, 灭菌, 接种和固定化培养。分离检测不同大小载体颗粒中固定化细胞的干重, 结果见图 1。

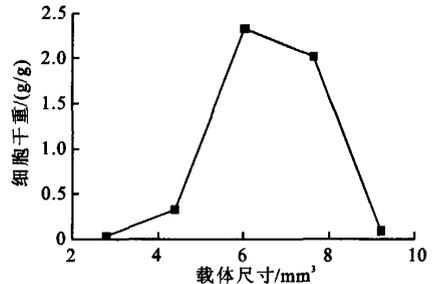


图 1 载体尺寸对产酶及固定细胞生物量的影响

Fig. 1 Effect of PUF size on the immobilized cell biomass

由图 1 可知, 当载体尺寸较小时, 固定的细胞较少。小颗粒载体在摇瓶振荡培养环境中, 载体内部受到流动培养基的冲击相对较大, 细胞难以稳定生长和固定; 而载体尺寸偏大时, 颗粒内部受到传质限制, 营养传递和供氧不畅, 不利于菌体生长。切片观察颗粒内部只有少量的菌丝体甚至无菌丝体。载体尺寸为 6 mm×6 mm×6 mm 立方体小块时, 颗粒固定细胞干重相对较大, 达到 2.32 g/g。

2.2.2 载体材料密度的影响 载体密度不同, 孔隙率也不同。在相同的培养条件下比较了密度为 40、27、9 kg/m³ 聚氨酯泡沫载体的细胞固定化效果, 结果见图 2。

由图 2 可知, 密度为 9 kg/m³ 的载体固定细胞量少, 切片镜检显示载体内仅有少量的菌丝体。可能是由于载体密度低, 内部孔隙空间较大, 可供细胞吸附生长固定的内部脊壁面积小, 影响细胞在载体内稳定生长和有效固定。密度高的 40 kg/m³ 载体固定细胞量也相对较少, 可能是载体孔隙小, 细胞易堵塞载体的外表面, 影响了细胞的进入生长。当载体密度为 27 kg/m³ 时细胞固定量相对较好。

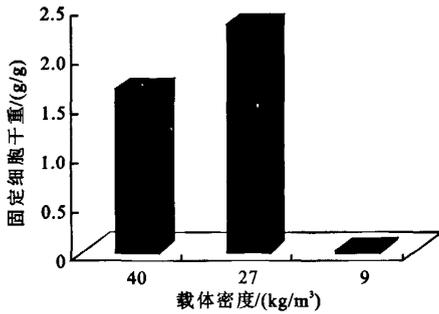


图 2 载体密度对固定细胞生物量的影响

Fig. 2 Effect of PUF density on the immobilized cell biomass

2.2.3 固定化培养体系中的细胞分布和固定化细胞的稳定性 *Geotrichum link* NS3 固定化培养完毕后,过滤分离载体颗粒,用生理盐水洗涤至固定化细胞颗粒干重恒重,离心收集洗脱的细胞,105 ℃干燥至恒重。同时,离心发酵液,洗涤收集细胞,恒重,结果见图 3~4。

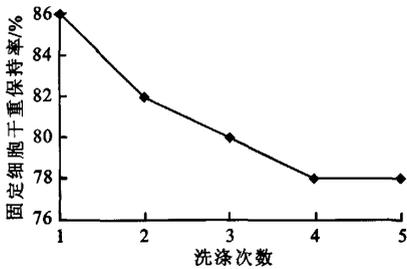


图 3 洗涤次数对载体固定细胞干重的影响

Fig. 3 Effect of washing PUF on the cell biomass immobilized

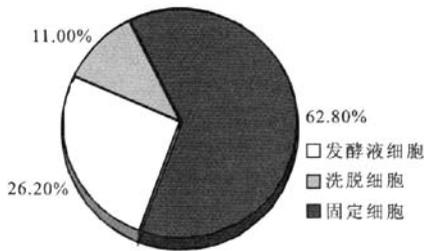


图 4 细胞在聚氨酯泡沫载体内外的分布

Fig. 4 Desperation of cell in or out PUF

由图 3 可知,洗涤 5 次后,固定细胞干重趋于稳定,剩下的细胞稳定地固定在聚氨酯泡沫内。由图 3 可知,聚氨酯泡沫的微孔结构为菌体提供了良好的生长和固定微环境。固定发酵结束时载体中固定了大约 73.8% 生物量,远大于发酵液的细胞生物量。

万方数据

2.2.4 载体内细胞生长固定方式的微观考察 为了解 *Geotrichum link* NS3 在聚氨酯泡沫载体内的生长固定情况,采用电镜扫描细胞固定化颗粒,结果见图 5。

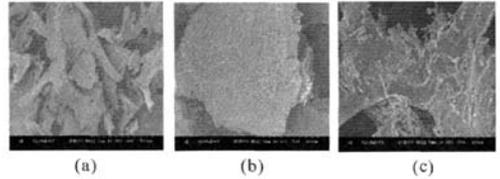


图 5 聚氨酯泡沫固定 *Geotrichum candidum* NS3 电镜扫描图(依次为 100 倍,500 倍,500 倍)

Fig. 5 SEM photos of *Geotrichum candidum* NS3 adhered to the PUF inner surface

从电镜扫描图 5(a) 看出, *Geotrichum candidum* NS3 在载体孔隙内缠绕充盈,生长固定良好。图 5(b) 是载体内部的游离块状菌团,游离块状菌团的出现主要是由于细胞固定化颗粒在扫描电镜制样干燥过程中,载体孔隙内固定化菌团因脱水收缩断裂,部分脱落而形成。图 5(c) 显示,菌体在载体内部的脊壁上生长依附,固定结构稳定。

2.3 固定化细胞酶催化反应稳定性考察

2.3.1 水解酶活的稳定性 由图 6 可知,经过 5 批反应,固定细胞催化的桐籽油水解率由 42.8% 降至 27%,相对水解酶活保持率为 63.1%。载体固定细胞的干重由 2.32 g/g 降至 1.65 g/g,固定细胞干重保持率为 71%,固定化细胞颗粒显示出良好的细胞固定稳定性和酶活保持率。

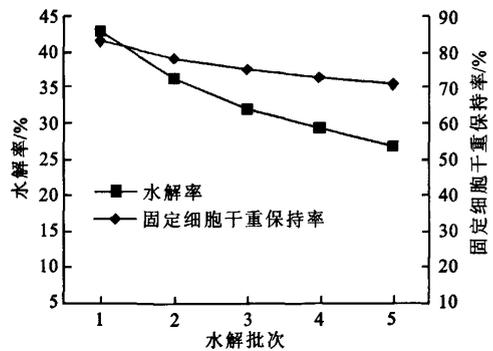


图 6 细胞脂肪酶水解酶活稳定性

Fig. 6 Stability of hydrolytic lipase activity

2.3.2 合成酶活的稳定性 结果见图 7 所示。由图 7 可知,经过 5 批反应,酯化率由 70.9% 降至 47.8%,合成酶活保持率为 67.4%,较桐籽油 5 批水解反应后水解酶活保持率下降幅度稍大,这可能是因为甲醇的存在导致脂肪酶活力下降,造成固定化细胞酶活损失。载体固定细胞干重保持率为

69%，与桐籽油5批水解反应后的固定细胞损失相近。

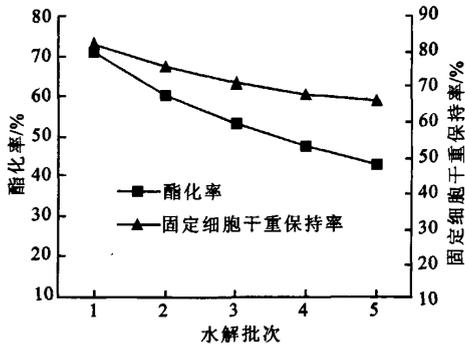


图7 细胞脂肪酶合成酶活稳定性

Fig.7 Stability of synthetic lipase activity

3 结论

从南昌含油土壤中筛选到1株产脂肪酶活力较强的白地霉菌株 *Geotrichum candidum* NS3, 其水解酶活和合成酶活分别达到321 U/g和0.54 U/g。聚氨酯泡沫载体固定白地霉 *Geotrichum candidum* NS3细胞的合适条件为:聚氨酯泡沫颗粒尺寸6 mm×6 mm×6 mm,密度27 kg/m³,30 ℃,固定培养60 h。固定化培养中有73.8%的细胞进入聚氨酯泡沫中生长固定,载体固定细胞干重达到2.32 g/g。扫描电镜图片显示 *Geotrichum candidum* NS3在载体内部的空隙和脊壁上生长固定良好,结构稳定。固定化细胞具有较稳定的催化油脂水解和酯化合成能力,固定化细胞颗粒在连续多批次催化水解和酯化合成反应中显示出较好的细胞固定稳定性和酶活保持率。

参考文献(References):

- [1] 吴伟斌,施碧红,温建新,等. 耐热脂肪酶产生菌FS1403的分离筛选16SrDNA基因序列的分析[J]. 药物生物技术, 2008,15(1):6-10.
WU Wei-bin, SHI Bi-hong, WEN Jiang-xin, et al. Classification of thermostable lipase-producing bacterium and cloning of lipase gene[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2008,15(1):6-10. (in Chinese)
- [2] 张博,杨江科,苏华武,等. 脂肪酶产生菌的筛选、鉴定及其产酶条件优化[J]. 生物技术, 2007,17(1):23-26.
ZHANG Bo, YANG Jiang-ke, SU Hua-wu, et al. Screening, identification of lipase production bacteria and optimization of the lipase production[J]. *Biotechnology*, 2007,17(1):23-26.
- [3] Kazuhiro Ban, Masaru Kaiedab, Takeshi Matsumotoc, et al. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001,8(1):39-43.
- [4] Shinji Hamaa, Hideki Yamaji, Takahiro Fukumizu, et al. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007(34):273-278.
- [5] 王龙英,李孝辉,费笛波,等. 碱性脂肪酶高产菌株yz-145的筛选及产酶条件[J]. 浙江农业学报, 2004,16(3):123-126.
WANG Long-ying, LI Xiao-hui, FEI Di-bo, et al. Mutation breeding of an alkaline high-yield lipase strain yz-145 and study of fermentation conditions[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2004,16(3):123-126. (in Chinese)
- [6] 谭珍连,梁静娟,庞宗文,等. 原生质体紫外诱变选育白地霉GXU08脂肪酶高产菌株[J]. 生物技术, 2007,17(2):42-44.
TAN Zhen-lian, LIANG Jing-juan, PENG Zong-wen. Breeding of higher lipase-activity mutants by protoplast mutagenesis of ultraviolet irradiation [J]. *Biotechnology*, 2007,17(2):42-44. (in Chinese)
- [7] 邓利,谭天伟,王芳. 脂肪酶催化合成生物柴油的研究[J]. 生物工程学报, 2003,19(1):97-100.
DENG Li, TAN Tian-wei, WANG Fang. Studies of enzymatic synthesis of biodiesel[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003,19(1):97-100. (in Chinese)
- [8] 郭勇. 酶工程[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.
- [9] 李迅,李治林,杨杨,等. 制备生物柴油用脂肪酶产生菌的诱变和筛选[J]. 林产化学与工业, 2007,27(6):85-89.
LI Xun, LI Zhi-lin, YANG Yang, et al. Inducing and screening of lipase-producing strain for biodiesel fuel production[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2007,27(6):85-89. (in Chinese)
- [10] 沈萍,范秀容,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [11] 郑毅,施巧琴. 由扩展青霉(*Penicillium expansum*)PF868产生脂肪酶催化油脂水解的研究[J]. 工业微生物, 1999,29(1):17-20.
ZHENG Yi, SHI Qiao-qin. Hydrolysis of oils and fats catalyzed by lipase from *Penicillium expansum* PF868[J]. *Industrial Microbiology*, 1999, 29(1):17-20.
- [12] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1989.

(责任编辑:李春丽)