

文章编号: 1673-1689(2007)03-0062-05

粗状假丝酵母(*Candida valida* T2)生产 脂肪酶的发酵条件

肖海群, 段学辉, 牛春铃

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330031)

摘要: 对粗状假丝酵母产生脂肪酶的培养条件进行了研究。结果表明, 该菌株产脂肪酶的适宜培养基组成为: 桐油 15 mL/L, 黄豆粉 30 g/L, 糊精 10 g/L, 硝酸铵 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, Tween 80 0.5 g/L; 最佳培养为温度 30 °C、发酵液起始 pH 6, 摇瓶发酵脂肪酶活力达到 1 467 U/mL。

关键词: 粗状假丝酵母; 脂肪酶; 发酵

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Studies on the Fermentation Process for Lipase Production by *Candida valida* T2

XIAO Hai-qun, DUAN Xue-hui, NIU Chun-ling

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: In this manuscript, the nutritional and environmental conditions of lipase production by *Candida valida* was investigated. The optimal medium compositions for lipase production were as follows: tung oil 15 mL/L, bean flour 30 g/L, dextrin 10g/L, NH_4NO_3 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, Tween 80 0.5 g/L. With combination with the optimum enviromental conditions (30 °C and pH 6.0), a highest lipase activity reached was achieved(1467 U/mL).

Key words: *Candida valida* T2; lipase; fermentation

脂肪酶(Lipase, EC3. 1. 1. 3,)即甘油酯水解酶,适合于异相系统或水不溶系统的油(脂)-水界面上水解油脂^[1]。自 20 世纪 80 年代以来,界面酶学和非水相酶学的研究和应用取得了突破性的进展,脂肪酶的多功能催化作用在食品、皮革、造纸、有机合成、油脂化学工业,以及洗涤剂、化妆品、医药、生物能源等领域得到广泛应用。脂肪酶在许多动植物及微生物中均存在。工业用脂肪酶主要来源于

微生物生产菌发酵,常见的微生物类型有假丝酵母^[2-3]、根霉^[4]、青霉^[5]和假单胞菌^[6-7]等,其中假丝酵母(*Candida sp.*)是目前国内外研究较多的产脂肪酶菌种。B. S. Kim 等^[8]利用高密度发酵柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)生产脂肪酶,最高发酵水平达到 23.1 U/mL;D. Liu^[9]等通过大肠杆菌进行南极假丝酵母脂肪酶基因表达,发酵酶蛋白活力达到 61 U/mg;何耀强等^[10]对一株突变高产脂

收稿日期:2006-12-03.

基金项目:江西省科技攻关项目(20041B0103000).

作者简介:肖海群(1980-),女,江西吉安人,食品科学硕士研究生. Email: qun1024@hotmail.com

通讯作者:段学辉(1958-),男,江西永新人,工学博士,硕导,教授,主要从事生物技术、发酵工程方面的研究.

Email: xhduan_1@hotmail.com

脂肪酶假丝酵母 99-125 菌株进行产酶条件优化研究,摇瓶发酵水平达到 5 000 IU/mL。同时,产脂肪酶新菌株的筛选和开发研究受到关注^[1]。作者探讨了粗状假丝酵母(*Candida valida* T2)发酵生产脂肪酶的影响因素,并对其培养基组成和产酶条件进行了优化研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

粗状假丝酵母 *Candida valida* T2,作者所在实验室保藏。

1.2 培养基组成

1) 斜面培养基(g/L):蔗糖 5,蛋白胨 5,NaCl 3,K₂HPO₄ 2,酵母浸膏 5,琼脂 20。

2) 种子培养基(g/L):蔗糖 5,蛋白胨 5,NaCl 3,K₂HPO₄ 2,酵母浸膏 5。

3) 发酵培养基(g/L):蛋白胨 20,蔗糖 5,橄榄油 5,(NH₄)₂SO₄ 1,MgSO₄·7H₂O 1,K₂HPO₄ 2。

1.3 发酵实验

将斜面菌种接种到 30 mL(250 mL 的三角瓶)种子培养基中,于 30 °C、200 r/min 的条件下培养 26 h。然后按体积分数 10% 的接种量接入到 60 mL(250 mL 的三角瓶)发酵培养基中,在 30 °C、160 r/min 进行发酵产酶试验,定时取样,离心后取上清液测定脂肪酶的活力。

1.4 测定方法

脂肪酶酶活的测定^[12]:采用橄榄油乳化液测定法,配制 2 g/dL 的聚乙烯醇(PVA-124)溶液,与橄榄油按体积比 3:1 混合后高速均质搅拌 3 min,制得橄榄油乳化液,取 5 mL 乳化液与 4 mL 磷酸缓冲液(0.025 mol/L,pH 7.5)混合,在 40 °C 水浴中预热 5 min,加入发酵样液 1 mL,反应 30 min 后加入 15 mL 95% 乙醇终止反应,以酚酞作指示剂,用 0.05 mol/L 的 NaOH 溶液滴定至液体呈粉红色。与空白样对比计算其酶活。在测定条件下,每分钟释放出 1 μmol 脂肪酸的酶量定义为 1 个酶活单位(U)。

2 结果与讨论

2.1 菌体生长曲线的测定

将菌种接入装有 60 mL 摇瓶发酵培养基的 250 mL 的三角瓶中,30 °C、200 r/min 振荡培养,每 6 h 取样分析酶活,并测定细胞浓度,细胞生长曲线和产酶曲线见图 1。

由图 1 可见,细胞从 18 h 开始进入生长的对数

期,48 h 以后转入生长稳定期。而酶的产生是在细胞生长的对数中期开始增长,伴随着生物量的增加而增加,在细胞进入稳定期以后产酶量达到最高,此后下降,发酵过程中脂肪酶的产生与生物量的增长具有一定的相关性。

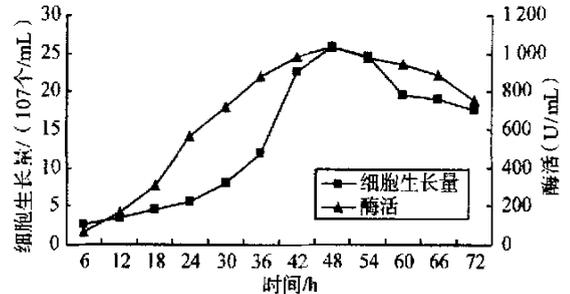


图 1 粗状假丝酵母的生长曲线和产酶曲线

Fig. 1 The curve of cell growth and lipase production of *Candida valida* T2

2.2 发酵温度的选择

为考察实验菌最适的生长和代谢温度,在 26~38 °C 范围进行培养和产酶跟踪实验,结果见图 2。从图 2 可以看出,菌体发酵的适宜温度范围在 28~32 °C 之间,30 °C 时酶活相对较高。

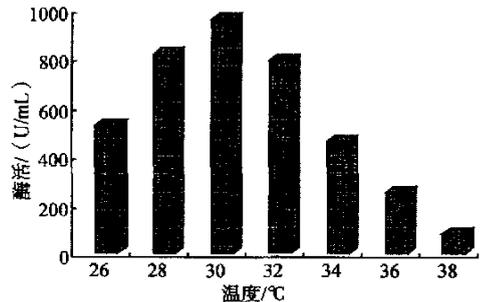


图 2 温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on lipase production

2.3 起始 pH 值对产酶的影响

pH 值是微生物生存的外部环境之一,也是影响微生物发酵的一个重要因素。对培养基的起始 pH 值用 NaOH 或 HCl 溶液分别调 pH 至 4.0~9.0,在 30 °C 条件下发酵 48 h,离心收集发酵液,测定脂肪酶活力,结果见图 3。从图 3 可以看出,当起始 pH 值为 6.0 时,发酵液酶活力相对较高。

2.4 不同装液量对发酵效果的影响

采用一定的摇床转速和培养瓶时,装液量是控制培养液通气量的主要因素。在 250 mL 的三角瓶中分别装 25,30,40,50,60,70 mL 发酵培养基,30 °C、200 r/min 培养 48 h。离心分离菌体,测定发酵液酶活,结果见图 4。从图 4 可知装液量在 60 mL

时,酶活力相对较高。

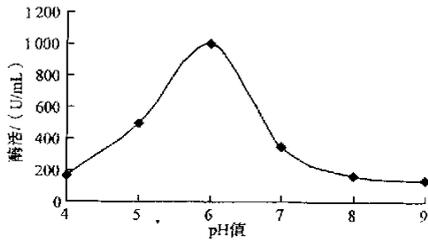


图 3 起始 pH 值对产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial pH on lipase production

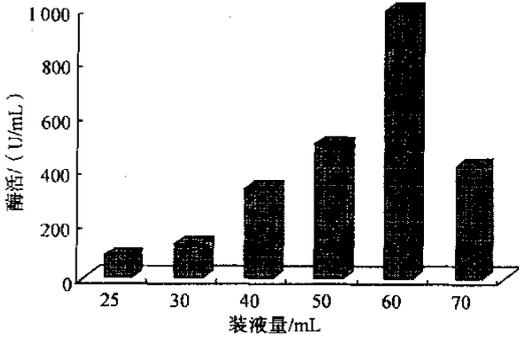


图 4 装液量对产酶的影响

Fig. 4 Effect of medium volume on lipase production

2.5 种龄的影响

种子的培养时间即种龄,一般的原理是以菌体处于生命力极为旺盛的对数生长期为宜,此时的种子质量高,接入发酵培养基后能很快进入对数生长,有利于缩短发酵周期和提高产酶率,接入的种子过老,由于菌体活力不够,会引起产酶能力下降和菌体过早衰老、自溶。因此,选择合适的种龄,既有利于菌体的快速增殖,又能使得菌体产酶的量达到最大。为此,作者选择了进入对数期不同时间的种子转入发酵培养基,结果见图 5,可见最适宜的种龄是培养 26 h,其发酵产酶活力相对较高。

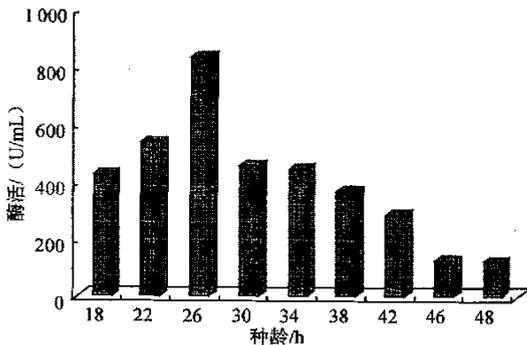


图 5 种龄对产酶的影响

Fig. 5 Effect of seed culture time on lipase production

2.6 接种量对酶活的影响

种子接种量的大小对微生物发酵周期和产酶水平有较大影响。接种量偏小,生物量增长缓慢,发酵周期延长,导致菌体活力降低,不利于产酶。合适的接种量有利于发酵在较短的时间内获得足够的菌体,有利于酶的生产。但接种量过大,会导致菌体过快增长和带入过多的种子培养代谢物,使发酵微生物容易衰老,不利于稳定产酶。因此,恰当的接种量,既能保证合理缩短发酵周期,又能得到较高的发酵产酶水平。在工业生产上,接种量的选择既要与种子罐和发酵罐的实际罐容相匹配。又要与菌种的生长繁殖速度和产物代谢特性相适应。作者考察了一定营养条件下接种体积分数分别为 3.0%、5.0%、10.0%、12%、15% 时菌体的生长和产酶情况,结果显示不同接种量其发酵的最高菌体浓度接近,但产酶活力不同,接种体积分数为 10% 时发酵产酶活力较高,达到 1467 U/mL。

2.7 不同表面活性剂对脂肪酶生产的作用

由于表面活性剂能改变细胞膜的通透性并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量^[13]。作者考察了 4 种表面活性剂及其不同质量浓度对产酶的影响。以不加表面活性剂的发酵液酶活力为 100%,相对酶活力为加表面活性剂与不加表面活性剂的酶活比。实验中观察到菌体生长情况没有明显的变化。从表 1 结果可以看出,Tween 80 与阿拉伯树胶对产酶都有一定的促进作用,其中 Tween 80 使酶产量提高了 5 倍多;而聚乙二醇与 SDS(十二烷基硫酸钠)对脂肪酶的生产具有一定的抑制作用。

表 1 表面活性剂对产酶的影响

Tab. 1 Effect of surfactants on lipase production

表面活性剂	相对酶活/%		
	0.05 g/dL	0.1 g/dL	0.15 g/dL
空白	100	100	100
Tween 80	503	285	324
SDS	33	33	67
聚乙二醇	83	33	50
阿拉伯树胶	101	115	120

2.8 不同碳源对产酶的影响

培养基分别选用不同质量浓度的可溶性淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糊精、玉米粉、糊精为碳源,观察它们对培养菌产酶的影响,结果见表 2。

结果表明,葡萄糖、蔗糖不利于培养菌生产脂肪酶,它们的存在可能对粗状假丝酵母 *Candida*

valida T2 代谢脂肪酶产生一定的抑制作用,而以糊精为碳源时,发酵液脂肪酶活相对较高。

表2 不同碳源和浓度对脂肪酶产生的影响

Tab. 2 Effect of carbon sources on lipase production

碳源	酶活/(U/mL)		
	5 g/L	10 g/L	20 g/L
可溶性淀粉	27	30	0
葡萄糖	0	0	0
蔗糖	0	20	37
麦芽糊精	47	53	13
玉米粉	17	33	7
糊精	333	617	70

2.9 不同氮源对产酶的影响

在摇瓶筛选培养基中分别加入不同种类的有机氮或无机氮,30 °C、200 r/min 发酵 48 h 后测定酶活,结果如表 3。比较表 3 结果可以看出,培养基中各种氮源对细胞的作用不同。粗状假丝酵母 *Candida valida* T2 以黄豆粉为氮源时的生长和代谢状况相对更好一些,最高酶活力达到 1133 U/mL。利用廉价的黄豆粉作为氮源,在大规模工业生产中具有重要意义。

表3 氮源对脂肪酶产生的影响

Tab. 3 Effect of nitrogen sources on lipase production

氮源	酶活/(U/mL)		
	10 g/L	20 g/L	30 g/L
酵母浸膏	17	850	633
牛肉膏	850	633	767
尿素	17	50	50
蛋白胨	483	483	750
黄豆粉	33	350	1133
硝酸铵	567	733	783
硫酸铵	267	200	583

2.10 碳源、氮源正交试验

在碳、氮源单因子实验的基础上,确定了发酵产酶的碳源、氮源和诱导底物的种类选择。组合底物正交实验的结果和分析见表 4、5。从表 5 中直观分析(极差分析)即 R 值的大小可以看出,硝酸铵对产酶的影响最大,其次是黄豆粉。产酶最佳的碳氮源为:15 g/L 桐油,30 g/L 黄豆粉,10 g/L 糊精,10 g/L 硝酸铵。

2.11 不同油脂对脂肪酶生产的诱导作用

油脂在脂肪酶合成过程中起碳源作用,同时也是诱导剂,因此油脂是一重要组分。在发酵培养基

内加入不同种类和质量浓度的油脂,在优化条件下进行发酵,结果见表 6。由表 6 可知,产酶活力在底物为橄榄油时最佳,其次是桐油。考虑到后期生物柴油研究的原料来源,认为以桐油为产酶诱导物是进一步实验研究的重点。

表4 正交实验因素水平的设计

Tab. 4 Design of factors and levels in orthogonal experiment

水平	桐油	糊精	黄豆粉	硝酸铵
	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)
1	5	5	10	10
2	10	10	20	20
3	15	20	30	30

表5 $L_9(3^4)$ 正交试验结果Tab. 5 Medium optimization by orthogonal design $L_9(3^4)$

水平	桐油	糊精	黄豆粉	硝酸铵	酶活/ (U/mL)
	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)	质量浓度/ (g/L)	
1	5	10	5	10	400
2	5	20	10	20	434
3	5	30	20	30	466
4	10	10	10	30	46
5	10	20	20	10	546
6	10	30	5	20	400
7	15	10	20	20	40
8	15	20	5	30	46
9	15	30	10	10	1234
K_1	1300	486	846	2180	
K_2	992	1026	1714	874	
K_3	1320	2100	1052	558	
k_1	433.33	162	282	726.67	
k_2	330.67	342	571.33	291.33	
k_3	440	700	94	186	
R	109.33	538	477.33	540.67	

最优组合:桐油 15 g/L,黄豆粉 30 g/L,糊精 10 g/L,硝酸铵 10 g/L

表6 不同油脂对脂肪酶产生的影响

Tab. 6 Effect of different oil ester on lipase production

油脂	酶活/(U/mL)		
	5 g/L	10 g/L	15 g/L
橄榄油	67	200	1 383
桐油	83	800	1 350
菜籽油	50	33	1 283
大豆油	33	267	617

3 结 论

发酵过程的温度、起始 pH 值、溶氧等因素对粗状假丝酵母 *Candida valida* 2T 的生长和产脂肪酶能力具有明显的影响。发酵条件优化实验结果表明,培养基组成为桐油 15 g/L,黄豆粉 30 g/L,糊精 10 g/L,硝酸铵 10 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, Tween 80 0.5 g/L, 起始 pH 值为 6.0, 培养温度为 30 °C, 160 r/min 培养 48 h, 细胞生长和发酵产酶活力较高, 发酵液酶活达到 1467

U/mL。

对胞外脂肪酶生产, 表面活性剂通常是一个重要的影响因素。Gulati^[14] 等人研究认为, 表面活性剂、阿拉伯树胶可以促进黑曲霉 *Aspergillus terreus* 产生脂肪酶。研究结果显示, 表面活性剂 Tween 80 和阿拉伯树胶均能不同程度地促进粗状假丝酵母 *Candida valida* 2T 脂肪酶的发酵生产, 且 Tween 80 更有利于该菌株脂肪酶生产, 而聚乙二醇与 SDS 则对实验菌株脂肪酶的产生有一定的抑制作用。

参考文献(References):

- [1] 张树政主编. 酶制剂工业(下册)[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 655-670.
- [2] 宋庆训, 林金萍, 戎一平. 脂肪酶产生菌 *Candida rugosa* 的产酶条件研究[J]. 生物工程学报, 2001, 17: 104-109.
SONG Qing-xun, LIN Jin-ping, RONG Yi-ping, et al. Studies on lipase production from *Candida rugosa* [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2001, 17: 104-109.
- [3] Montesinos L, Dalmau E, Casas C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa* [J]. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2003, 78: 753-761.
- [4] Ikram ul-Haq, Shumaila Idrees M, Ibrahim Rajoka. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* with solid-state fermentation [J]. **Process Biochemistry**, 2002, 37: 637-641.
- [5] 李江华, 邹敏辰, 邹显章. 圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵工艺条件 [J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 2(19): 100-104.
LI Jiang-hua, WU Min-chen, WU Xian-zhang. Fermentation technology of alkaline lipase produced by *Penicillium cyclospium* PG37 [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**, 2000, 2(19): 100-104.
- [6] 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 [J]. **Bioresource Technology**, 2002, 84: 207-211.
- [7] 高修功, 章克昌. 假单胞菌产脂肪酶条件的初步探索 [J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 152-155.
GAO Xiu-gong, ZHANG Ke-chang. Factors affecting lipase production of a *Pseudomonas sp.* strain [J]. **Microbiology**, 1997, 24(3): 152-155.
- [8] Beom Soo Kim, Ching T Hou. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea* [J]. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2006(29): 59-64.
- [9] D Liu, R D Schmid, M Rusnak. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm-a screening system for a frequently used biocatalyst [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2006, 72: 1024-1032.
- [10] 何耀强, 王炳武, 谭天伟. 假丝酵母 99-125 脂肪酶的发酵工艺研究 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(6): 918-921.
HE Yao-qiang, WANG Bing-wu, TAN Tian-wei. Fermentation production technology of lipase with *Candida sp.* 99212 [J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2004, 20(6): 918-921.
- [11] Gupta R, Rathi P, Gupta N, et al. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview [J]. **Biotechnol Appl Biochem**, 2003, 37: 63-71.
- [12] 郭勇主编. 酶工程 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 317-319.
- [13] 洪骏, 夏黎明. 产碱性脂肪酶菌株的筛选和培养 [J]. 过程工程学报, 2003, 10(5): 428-432.
HONG Jun, XIA Li-ming. Screening and culture of alkaline lipase-produced strain *Pseudomonas sp.* ZJU-02 [J]. **The Chinese Journal of Process Engineering**, 2003, 10(5): 428-432.
- [14] Gulati R, Saxena R K, Gupta R, et al. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis [J]. **Process Biochem**, 1999, 35: 459-464.

(责任编辑: 李春丽)