

脂肪酶产生菌 *Candida rugosa* 产酶条件研究

宋庆训 林金萍 戎一平 魏东芝*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 生物化学研究所 上海 200237)

关键词 *Candida rugosa*, 脂肪酶, 发酵条件优化

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0101-04

脂肪酶(Lipase, EC3.1.1.3)是用来催化酯类化合物的分解、合成和酯交换的特殊酶,具有高度的化学选择性和立体异构性,它广泛应用于食品、轻纺、皮革、香料、化妆品、洗涤剂、有机合成、医药等领域。本世纪 80 年代,美国科学家发现酶在近无水的有机溶剂中不仅能保存其催化活力,而且还获得许多新的催化特征^[1],此后,脂肪酶在非水相酶催化领域的研究和应用逐渐增多。

假丝酵母(*Candida*)脂肪酶作为一种重要的脂肪酶,已广泛应用于酸类和醇类外消旋物的拆分,国外已利用其催化不对称水解及酯化的特点合成除草剂、薄荷醇类、天然物质合成子等光学活性物质^[2]。本实验室保存的一株假丝酵母(*Candida rugosa*),其所产脂肪酶已证明能够选择性催化拆分萘普生混旋物(另文报道),目前,国内该酶全靠进口。本文对其产酶条件和扩大化培养进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

1.1.1 菌种 皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*) (本实验室保存)。

1.1.2 培养基成分(g/L):葡萄糖 10,橄榄油 20,尿素 2, KH_2PO_4 6, K_2HPO_4 2.1, MgSO_4 0.1, 肌醇 4×10^{-6} , 另外需要单独过滤除菌的有:生物素 8×10^{-6} , 维生素 B_1 2×10^{-4} 。^[3]

1.1.3 培养条件:A、三角瓶培养:50mL 培养基装于 500mL 三角瓶中,回转式摇床 200r/min, 30℃ 培养 60h。

B、发酵罐培养:3.5L 培养基装于 5L 发酵罐中, 500r/min, 30℃ 培养 60h。

1.2 试剂与仪器

聚乙烯醇为分析纯,上海石化水处理剂厂生产,摇床为 HYG-II 型回转式恒温调速摇瓶柜,上海欣蕊自动化设备有限公司制造,发酵罐为 B-5L 型,德国 B. Braun 公司制造。

1.3 脂肪酶活力测定

底物采用乳化系统:橄榄油与 2% 聚乙烯醇溶液以 1:3 比例混合后,高速匀浆,成为乳白色均匀稳定的乳化液,缓冲液采用 0.1mol/L pH7.2 的磷酸缓冲液,在测定条件下,以每分钟分解底物(橄榄油)释放出 1 μ mol 游离脂肪酸所需的酶量定义为 1 个脂肪酶活力单位(u)。

1.4 菌体干重测定

发酵液经离心,菌体用生理盐水洗涤,105℃ 烘干至恒重。

2 结果

2.1 碳源对脂肪酶产率和菌体生长的影响

2.1.1 单一碳源的影响 液体培养基除碳源外(葡萄糖,橄榄油),其它同 1.1.2 培养基成分中所列。碳源为碳水化合物(葡萄糖,蔗糖,淀粉),油酸或植物油(橄榄油,大豆色拉油),30℃ 培养 60h,结果见表 1。

表 1 单一碳源对脂肪酶产率和菌体生长的影响

Table 1 Effect of single carbon source on lipase production and cell growth

| Carbon sources/ (1.0%) | Biomass/ (g/L) | Lipase activity/ (u/mL) |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|
| Glucose | 7.3 | 4.8 |
| Sucrose | 7.0 | 4.2 |
| Starch | 5.0 | 3.5 |
| Oleic acid | 6.1 | 8.7 |
| Olive oil | 6.7 | 10.5 |
| Soyabean salad oil | 3.8 | 6.9 |

结果表明,培养基中的碳源对该酵母菌的脂肪酶产率和菌体生长影响很大,以碳水化合物作碳源时,菌体生长较好,而产酶很低;当用油酸或橄榄油作碳源时,菌体生长和产酶都比较好。

收稿日期 2000-07-03 修回日期 2000-10-20。

基金项目:国家“九五”攻关项目(96-C03-02-05),上海市科委攻关项目(984319122)和国家自然科学基金(29706003)资助项目。

* 通讯作者。Tel: 86-21-64252981; Fax: 86-21-64250068; E-mail: zdzwei@ecust.deu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.1.2 复合碳源的影响 :考虑到菌体的生长和对脂肪酶产生的诱导两方面的因素 ,选取上面实验中碳水化合物和油脂中单一效果较好的葡萄糖和橄榄油 ,将单一碳源改为复合碳

源 ,实验结果如表 2。这样 ,葡萄糖浓度为 0.1% ,橄榄油浓度在 4% 时最为合适。此时 ,脂肪酶活性最高 ,达到 14.3u/mL ,比单一碳源的最高酶活提高 36%。

表 2 复合碳源对脂肪酶产率和菌体生长的影响

Table 2 Effect of complex carbon source on lipase production and cell growth

| Glucose concentration/% | 0.1 | | | | 0.5 | | | | 1.0 | | | |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|
| Olive oil concentration/% | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 |
| Biomass/(g/L) | 6.9 | 7.1 | 7.3 | 7.3 | 7.0 | 7.3 | 7.3 | 7.2 | 7.3 | 7.4 | 7.3 | 7.2 |
| Lipase activity/(u/mL) | 11.8 | 13.1 | 14.3 | 13.2 | 10.6 | 10.9 | 11.4 | 10.5 | 7.6 | 8.8 | 10.2 | 8.3 |

2.2 氮源对脂肪酶产率的影响^[4]

液体培养基以 0.1% 葡萄糖、4.0% 橄榄油为碳源 ,选用有机氮源(豆饼粉、蛋白胨)、无机氮源(硫酸铵、硝酸铵、尿素)等单一或复合物作氮源 ,其它营养成分同前 ,实验结果如表 3。结果表明 ,在比较的氮源中 ,无机氮源较有机氮源和复合氮源更有利于脂肪酶的产生 ,在无机氮源中 ,以硝酸铵的作用效果最好 ,酶活高达 16.3u/mL。

表 3 氮源对脂肪酶产率的影响

Table 3 Effect of nitrogen source on lipase production

| Nitrogen source | Lipase activity/(u/mL) |
|---|------------------------|
| Soybean meal 2% | 3.2 |
| Peptone 2% | 3.4 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.5% | 15.6 |
| Urea 0.2% | 14.1 |
| NH ₄ NO ₃ 0.3% | 16.3 |
| Soybean meal 1% + (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.25% | 10.7 |
| Soybean meal 1% + NH ₄ NO ₃ 0.15% | 11.2 |

2.3 无机盐对产酶的影响

2.3.1 磷酸盐对产酶的影响 :实验结果(表 4)表明 ,适当浓度钾盐和钠盐的组合更有利于产酶 ,K₂HPO₄ 1.2%、NaH₂PO₄ 0.42% 时 ,酶活高达 17.4u/mL。

表 4 磷酸盐对产酶的影响

Table 4 Effect of phosphate on lipase production

| Phosphate | Lipase activity/(u/mL) |
|---|------------------------|
| K ₂ HPO ₄ 0.6% KH ₂ PO ₄ 0.21% | 15.9 |
| K ₂ HPO ₄ 1.2% KH ₂ PO ₄ 0.42% | 16.8 |
| K ₂ HPO ₄ 1.8% KH ₂ PO ₄ 0.63% | 16.0 |
| K ₂ HPO ₄ 1.2% NaH ₂ PO ₄ 0.42% | 17.4 |
| Na ₂ HPO ₄ 1.2% NaH ₂ PO ₄ 0.42% | 13.5 |

2.3.2 Mg²⁺对产酶的影响 :通过改变培养液中 MgSO₄·7H₂O 的浓度 ,所测培养液酶活如图 1。在该菌发酵过程中 ,0.4% 的 MgSO₄·7H₂O 最合适。

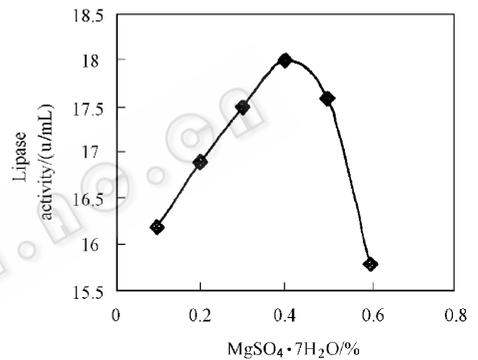


图 1 Mg²⁺对产酶的影响

Fig. 1 Effect of Mg²⁺ on lipase production

2.4 培养温度对产酶的影响

为探讨最适的培养温度 ,在以上实验的基础上 ,用改良的液体培养基 ,分别在 28℃、30℃、32℃ 摇瓶发酵 ,实验结果如图 2。在 28℃、30℃ 时发酵液最高酶活都能达到 18u/mL 以上 ,但是 ,在 30℃ 时发酵周期提前 12h ,因此在 30℃ 时发酵较好。

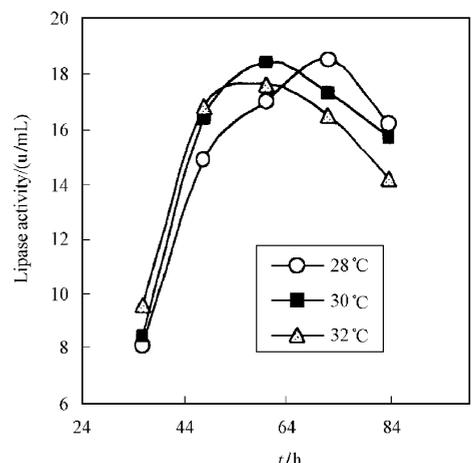


图 2 温度对产酶的影响

Fig. 2 Effect of temperature on lipase production

2.5 初始 pH 对产酶的影响

下面对培养液的初始 pH 值进行了初步试验,分别用 1.0mol/L HCl 和 1.0mol/L NaOH 调节发酵培养液的初始 pH 值为 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 30℃ 培养 60h 测其酶活 结果初始 pH 值为 6.5 时 酶活最高达 19.0u/mL。

2.6 摇床转速对产酶的影响

在 500mL 三角瓶中装上上述优化的培养基 50mL, 30℃, 用不同转速的摇床发酵, 实验结果如表 5。从结果可知, 摇床转速到 180r/min 时, 酶活达到 19.6u/mL, 转速继续增加时, 酶活没有明显增加。

2.7 表面活性剂对产酶的影响

本实验在上述优化实验的基础上, 选用 4 种不同的表面活性剂, 及其不同的浓度, 来分析其对产酶的影响。实验结果见表 6。结果表明, 适量的消泡剂——泡敌可以提高发酵液的酶活, 其最适用量为 0.03%, 酶活高达 27.2u/mL, 比对照组提高 39.5%。

表 5 摇床转速对产酶的影响

Table 5 Effect of rotational speed on lipase production

| Rotational speed/(r/min) | Lipase activity/(u/mL) |
|----------------------------|--------------------------|
| 140 | 13.9 |
| 160 | 17.2 |
| 180 | 19.6 |
| 200 | 19.7 |
| 220 | 19.5 |

2.8 扩大化培养

利用前面优化好的培养条件, 用 5L 发酵罐扩大培养。5L 发酵罐有控制溶氧、pH 值、补料等功能。图 3 是在 30℃、500r/min 通气量 2.0L/min pH 值控制在 6.0~6.5 之间的发酵实验结果。由图可知, 5L 发酵罐发酵较三角瓶培养周期缩短 12h, 最大酶活达到 33.5u/mL, 比摇床培养酶活提高 22%。

表 6 表面活性剂对产酶的影响

Table 6 Effect of surfactants on lipase production

| Surfactants Concentration/ % | GPE | | | | Tween-80 | | | Triton X-100 | | | SDS | | |
|---------------------------------|------|------|------|------|----------|------|------|--------------|------|-----|------|-----|-----|
| | 0 | 0.03 | 0.06 | 0.1 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.05 | 0.1 | 0.2 |
| Lipase activity/ (u/mL) | 19.5 | 27.2 | 21.5 | 13.5 | 13.6 | 13.2 | 13.5 | 8.9 | 12.5 | 9.4 | 5.6 | 4.8 | 3.1 |

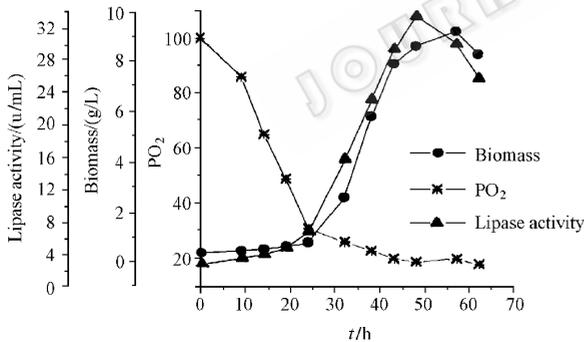


图 3 5L 发酵罐发酵结果

Fig. 3 The fermentation result of 5L fermentator

3 讨论

本文对假丝酵母(*Candida rugosa*)产胞外脂肪酶的培养基成分和培养条件进行了优化研究, 结果表明, 其培养基成分为葡萄糖 0.1%、橄榄油 4%、硝酸铵 0.3%、磷酸盐是 K_2HPO_4 1.2%、 NaH_2PO_4 0.42%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 为 0.4%, 初始 pH 值为 6.5, 培养温度为 30℃, 180r/min 摇床培养 60h, 培养液酶活高达 19.6u/mL。

实验发现表面活性剂对该酵母菌产脂肪酶影响很大, 加入 0.03% 的泡敌, 使培养液酶活高达 27.2u/mL, 另外在发酵罐中扩大培养时, 加入适量泡敌还有利于抑制发酵后期泡沫产生。我们用 5L 发酵罐扩大培养, 48h 酶活高达 33.5u/mL, 而且发酵周期缩短了 12h。在对该种脂肪酶粗酶的性质研究中, 发现其对萘普生混旋物催化拆分时, 只选择 S-对映体酯化, 这一性质在其它脂肪酶中是少见的, 使之具有很好的开发应用前景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zaks A, Klibanov A M. Enzymatic catalysis in organic media at 100℃. *Science*, 1984, **224**(4654):1249~1251
- [2] GU Q M (古渠鸣), Studies on lipases-catalyzed enantiospecific hydrolysis of (±)2-(6-Methoxy-2-Naphthyl)propionate esters, *Chinese Journal of Pharmaceuticals* (中国医药工业杂志), 1991, **22**(2) A9~54
- [3] Valero F, Ayats F, Poch M. Lipase production by *Candida rugosa*: fermentation behaviour. *Biotechnol Lett*, 1988, **10**(10): 741~744
- [4] Montesinos J L, Obradors N, Gordillo M A *et al.* Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **59** 25~37

Studies on Lipase Production from *Candida rugosa*

SONG Qing-Xun LIN Jin-Ping RONG Yi-Ping WEI Dong-Zhi
(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Research Institute of Biochemistry,
East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract We studied some factors affecting the lipase production from *candida rugosa*, they mainly included medium compositions and culture condition. The result showed that the optimal medium compositions for lipase production are 0.1% glucose 4.0% olive oil (carbon source), 0.3% NH_4NO_3 (nitrogen source), 1.2% K_2HPO_4 and 0.4% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. And the optimal culture condition is initial pH 6.5, temperature 30°C , agitation 180r/min and time 60h. As a result, and the lipase activity could reach 19.5u/mL. Meanwhile we found that the surfactant could be helpful to the lipase production, and the optimal surfactant concentration was 0.03% GPE. The lipase activity was improved by more than 170% after we optimized the medium compositions and culture condition. While in a 5L fermentator, the lipase activity of fermentation broth could reach 33.5u/mL within 48 hours.

Key words *Candida rugosa*, lipase, optimization of fermentation condition

Received July 3 2000

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (29706003).

* Corresponding author. Tel 86-21-64252981; Fax 86-21-64250068 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>