

# 固液态发酵中橄榄油对 *Rhizopus chinensis* 全细胞脂肪酶的影响\*

孙舒扬 王 栋 徐 岩\*\*

(江南大学生物工程学院教育部工业生物技术重点实验室 无锡 214036)

**摘要:** 主要对华根霉全细胞脂肪酶固态和液态两种发酵过程进行比较, 并着重探讨不同培养方式下橄榄油对其合成活力和水解活力的影响。结果表明: 液态培养较有利于菌体生长, 对脂肪酶的生产也有一定的促进作用。橄榄油的加入不仅有利于菌体生长、提高脂肪酶水解活力, 更可使脂肪酶的合成活力显著增加, 液态发酵下的效果更为明显。橄榄油在整个发酵过程中可能既作为碳源又是脂肪酶的诱导物。另外, 全细胞脂肪酶的水解活力和合成活力在固液态发酵条件下均存在不对应性, 表明华根霉可能产性质不同的脂肪酶同功酶。

**关键词:** 华根霉, 全细胞脂肪酶, 合成酶活, 固态发酵, 液态发酵, 橄榄油

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0010-05

## Effects of Olive Oil on Whole-cell Lipase Production of Solid-state and Submerged Fermentation by *Rhizopus chinensis*\*

SUN Shu-Yang WANG Dong XU Yan\*\*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology  
Southern Yangtze University, Wuxi 214036)

**Abstract:** The effects of solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) and the addition of olive oil on the whole-cell lipase production by *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 were investigated. Compared with SSF, higher biomass, hydrolytic activity and synthetic activity were observed in SmF. By the addition of olive oil, the synthetic activity of whole-cell lipase in both fermentations was enhanced significantly, especially in SmF, while the biomass and the hydrolytic activity were also increased. Hence, olive oil serves as both carbon source and the inducer of lipases in fermentation. It was also found that the synthetic activity of whole-cell lipase was not accordant to the hydrolytic activity during both SmF and SSF, suggesting that isoenzymes with difference in lipase properties may be produced by *Rhizopus chinensis*.

**Key words:** *Rhizopus chinensis*, Whole-cell lipase, Synthetic activity, Solid-state fermentation, Submerged fermentation, Olive oil

脂肪酶 (EC3. 1. 1. 3) 是一类催化酯水解或者合成的特殊酶类, 已被广泛用于香料制造、油脂加工、食品增香、医药中间体制备等领域中。由于脂肪酶能够在有机相中催化酯合成、转酯化、酯聚合、肽合成以及酰胺合成<sup>[1,2]</sup>等反应, 近几年其在有机合成中的作用日益突出, 被称为脂肪酶生物技术 (lipase biotechnology)。

微生物是脂肪酶生产的重要来源。不同微生物生产的脂肪酶性质各异, 有些菌株

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30470046)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30470046)

\*\* 通讯作者 Tel: 0510-5864112, E-mail: yxu@sytu.edu.cn

收稿日期: 2005-09-23, 修回日期: 2005-11-29

还可以产生多种性质不同的脂肪酶<sup>[3]</sup>,但目前研究的多为胞外水解酶。环境条件对脂肪酶的生产也有十分重要影响,发酵方式、培养条件等都会影响脂肪酶的生产。微生物发酵产酶主要有固态和液态两种形式,固态发酵获得脂肪酶的报道还相当少见。由于固液态发酵在水活度、传质、传热等方面存在诸多差异,使得菌体生长及代谢情况大不相同。*A. niger* 在固液态不同发酵方式下菌体形态不同<sup>[4]</sup>,发酵产生的阿魏酸酯酶<sup>[5]</sup>和果胶酶同工酶的性质<sup>[6]</sup>也有明显差别。根霉(*Rhizopus* sp.)在固液态条件下淀粉酶发酵表现不同也有报道<sup>[7]</sup>。关于脂肪酶的生产,已报道的多为液态发酵,而固态和液态两种发酵形式下比较的研究报道还很少。此外,脂肪酶的合成一般需要诱导物,这些诱导物包括橄榄油、蓖麻油、芝麻油等,橄榄油是其中效果较好的一种<sup>[8]</sup>。橄榄油在液态发酵中对脂肪酶水解活性的影响已有报道<sup>[9]</sup>,但在固态发酵条件下,橄榄油对脂肪酶发酵的影响的报道并不多见。

现有的关于脂肪酶的研究和生产的报道以胞外水解脂肪酶居多,有关全细胞脂肪酶,尤其是针对合成能力的全细胞脂肪酶的报道不多。全细胞脂肪酶可视为一种固定化的脂肪酶,稳定性好,能够重复使用。华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCC M201021 全细胞脂肪酶具备很强的酯合成能力,因而在生物柴油、芳香酯合成等方面具有良好的应用前景<sup>[10]</sup>。针对这种从固态发酵环境中分离得到的微生物在不同发酵条件下发酵产脂肪酶的比较研究尚未有报道。本论文通过研究华根霉全细胞脂肪酶固液态发酵过程的差异,以及橄榄油的添加对全细胞脂肪酶生产的影响,不仅有助于了解不同发酵形式以及诱导物对于微生物生长代谢等生理特性的影响,也为进一步探讨该菌种脂肪酶的发酵特性并为其工业应用提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

华根霉(*Rhizopus chinensis*) CCTCC M201021。

### 1.2 培养基

1.2.1 液态培养基:葡萄糖 0.2g,豆饼粉 1.8g,酵母膏 0.6g,  $\text{CaCl}_2$  0.06g,  $\text{ZnSO}_4$  0.015g,橄榄油 0.6mL,去离子水 30mL,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min 待用。

1.2.2 固态培养基:葡萄糖 0.4g,豆饼粉 3.6g,酵母膏 1.2g,  $\text{CaCl}_2$  0.12g,  $\text{ZnSO}_4$  0.03g,橄榄油 0.6mL,去离子水 15mL,谷壳 1g,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20min 待用。

### 1.3 培养方法

1.3.1 液态培养方法:每个 250mL 三角瓶中盛装液态培养基 30mL,接种量为  $10^8$  的孢子悬浮液 0.6mL。于 30℃, 150r/m 的摇床培养,每隔 8h 取样并分析。

1.3.2 固态培养方法:每个 250mL 三角瓶中盛装固态培养基 22g,接种量为  $10^8$  的孢子悬浮液 0.6mL。于 30℃ 的培养箱培养,每隔 8h 取样并分析。

### 1.4 脂肪酶的制备

固液态发酵的菌体均用去离子水以及 pH7.5 的磷酸缓冲溶液多次浸洗,将残留的培养基去除,再将菌体浸于适量 pH7.5 的磷酸缓冲液中,于冷冻干燥机中冻干制得。

### 1.5 分析测定方法

1.5.1 菌体量测定:麦角固醇是真菌细胞壁的组成成分,与菌丝体量之间存在着正比关系,因此,选择了麦角固醇作为 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 生长状况的指示

物<sup>[11]</sup>。

**1.5.2 脂肪酶水解酶活测定：橄榄油乳化液法<sup>[12]</sup>。**

**1.5.3 脂肪酶合成酶活测定：**分别取浓度为 1.2mol/L 的辛酸和乙醇的庚烷溶液 1.0mL 到 10mL 离心管中，混合均匀，加入 20mg 干菌体，在 40℃ 空气振荡器中反应 30min，反应结束后立即离心去除菌体，然后从上层清液中吸取 400 $\mu$ L 反应液并加入 100 $\mu$ L 内标（己醇），气相检测生成的辛酸乙酯。气相柱为 PEG20000，检测器为 FID，采用程序升温，起始温度 90℃ 维持 5min，以 10℃/min 速率升温 11min，最终温度 200℃，保留时间 5min。在此条件下，1min 生成 1 $\mu$ mol 的辛酸乙酯所需的酶量定义为 1 个合成酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固态和液态发酵过程比较

华根霉 CCTCC M201021 在固态和液态发酵过程中菌体量、全细胞脂肪酶的水解活性和合成活性酶活的变化如图 1 和图 2 所示。通过比较发现在固液态培养过程中全细胞脂肪酶的表现有明显差异，液态发酵菌体开始迅速生长较之固态提前 16h，而且液态发酵的最大菌体量是固态的 1.74 倍。因此，华根霉生长受环境的影响较大，液态发酵的水分充足，混合充分，传质、传氧效果较好，有利于菌体生长。此结果与根霉在固态发酵过程中产酶量较大的结论<sup>[7]</sup>不一致。

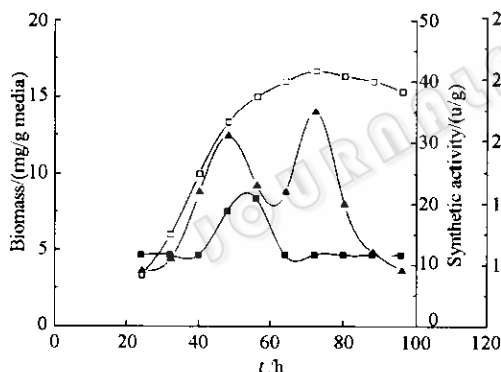


图 1 固态发酵过程

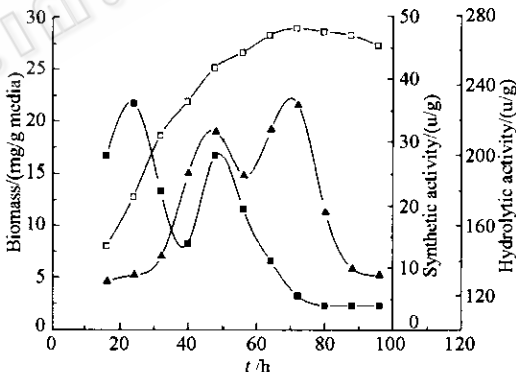


图 2 液态发酵过程

—□— 菌体量，—■— 全细胞脂肪酶水解酶活，—▲— 全细胞脂肪酶合成酶活

全细胞脂肪酶的水解活力在不同发酵过程中差异显著。固态发酵过程中全细胞脂肪酶的水解活力较低，最高仅为 160u/g；液态培养下全细胞脂肪酶水解酶活相对较高，在 24h 和 48h 有两个产酶高峰，活力分别达到了 230u/g 和 210u/g。液态发酵中较好的传质、传热和传氧效果可能有利于水解性脂肪酶的发酵。同时由于液态发酵前期（50h），菌体生长处于游离态中，而后期菌体以摇瓶壁为附着点持续生长，其状态接近于固态发酵，这种类似于“二次发酵”的生长状态可能是出现两个酶活高峰的原因。

与此相比，全细胞脂肪酶的合成活性在固液态发酵过程中的变化比较相似，两者都在约 48h 和 72h 分别出现两个酶活高点，活性也比较接近，说明固态和液态发酵对其影响不大。比较全细胞脂肪酶水解活性和合成活性的变化情况发现，两者间的变化趋势并不相同，有明显的不对应性<sup>[1]</sup>。由于微生物菌体中可能存在脂肪酶的同功酶，

而主要催化合成和水解反应的脂肪酶可能是不同的,即存在水解性脂肪酶和合成性脂肪酶,这可能是造成这种不对应性的原因。这种区别究竟是酶本身催化特性的不同,还是其他因素的影响还有待进一步探讨。

2.2 橄榄油对华根霉产全细胞脂肪酶的影响

通过比较固态和液态发酵过程中不同时期添加及不添加橄榄油,较全面地考察了橄榄油对全细胞脂肪酶产生的影响,结果如图 3、4。

首先,无论是固态还是液态发酵,橄榄油对于菌体生长均有促进作用。发酵起始添加橄榄油或者在中期补加橄榄油,与不添加橄榄油的发酵相比,菌体量均明显增加。固态发酵在添加橄榄油之后菌体量增加了 51%,液态培养在补加橄榄油后菌体量增加了一倍多。结果表明,橄榄油能够作为有利于华根霉生长的一种碳源。

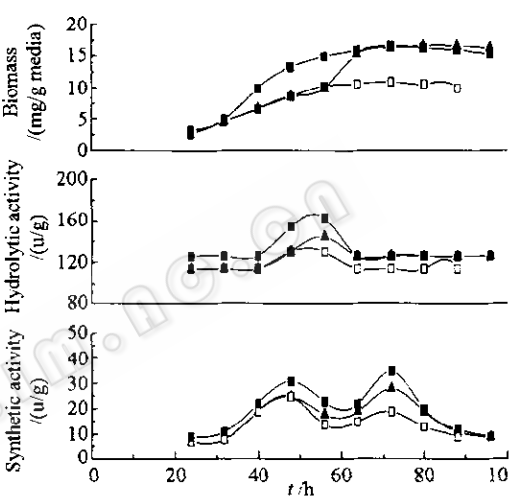
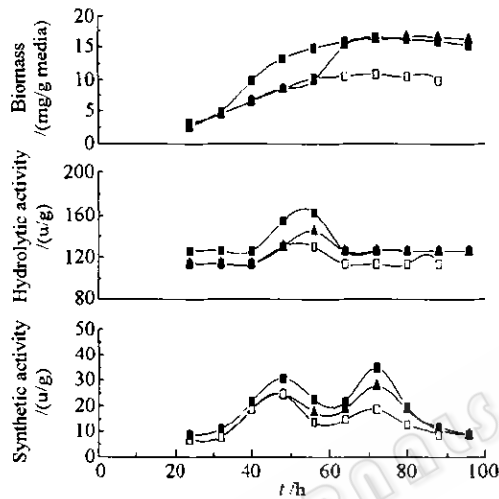


图 3 橄榄油对固态发酵产全细胞脂肪酶的影响      图 4 橄榄油对液态发酵产全细胞脂肪酶的影响  
—□— 不加橄榄油, —▲— 发酵中期(48h)补加橄榄油, —■— 起始培养基中添加橄榄油

添加橄榄油后,固液态发酵的全细胞脂肪酶水解活性尽管表现不同,但还是可以发现橄榄油的诱导作用。无论固态还是液态发酵,起始培养基中含有橄榄油发酵得到的全细胞脂肪酶的水解活力均高于不含橄榄油的培养基,最高酶活分别提高了 25% 和 10%。即使在发酵中期补加橄榄油,水解酶活也有提高,特别是固态发酵,最高活性提高了 12%。橄榄油对水解性脂肪酶的产生有诱导作用,这与许多报道结果一致<sup>[8]</sup>,但橄榄油在固态发酵中的诱导作用更强一些。

相比之下,对于全细胞合成性脂肪酶,橄榄油的诱导作用在液态发酵条件下更为明显。在不添加橄榄油的条件下,固态发酵中全细胞脂肪酶的合成活性高于液态发酵;而橄榄油添加后,液态发酵的合成活性高于固态发酵。尤其在发酵中期补加橄榄油后,固态发酵全细胞脂肪酶的最高合成活力增加 50%,而液态发酵全细胞脂肪酶的最高合成活力则迅速提高 3 倍。固液态发酵合成脂肪酶在补加橄榄油后合成活力均有十分明显的提高,可以看出橄榄油能够诱导合成性脂肪酶的形成,但橄榄油对液态发酵产生的合成性脂肪酶的诱导作用更为明显。

综上所述,在固态和液态两种不同的发酵过程中,橄榄油的加入均有利于菌体生长,对全细胞脂肪酶的水解活力和合成活力也有促进作用,可以认为橄榄油在整个发

酵过程中既作为一种碳源, 又是脂肪酶的诱导物。同时, 橄榄油在固态和液态发酵条件下对全细胞脂肪酶水解活性和合成活性的影响不一致, 进一步表明华根霉中可能存在性质不同的脂肪酶。

为从酶学水平上解释上述现象, 应对胞内酶进行纯化, 从而能够确定合成脂肪酶和水解脂肪酶究竟是脂肪酶同功酶还是一种多功能的脂肪酶, 探明这一问题将有助于针对性地指导脂肪酶的工业生产和应用。相关研究正在进行中。

### 参考文献

- [1] Wu X Y, Jääskeläinen S, Linko Y Y. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, **19**: 226 ~ 231.
- [2] Kamini N R, Iefuji H. *Process Biochemistry*, 2001, **37**: 405 ~ 410.
- [3] Lee D W, Kim H W, Lee K W, *et al.* *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29**: 363 ~ 371.
- [4] Papagianni M, Nokes S F, Filer K. *Process Biochemistry*, 1999, **35**: 397 ~ 402.
- [5] Ather M, Haon M, Roussos S, *et al.* *Process Biochemistry*, 2002, **38**: 685 ~ 691.
- [6] Alfredo M C, Blanca A T A, Guillermo A, *et al.* *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, **21**: 25 ~ 31.
- [7] Soccol C R, Iloki I, Marin B, *et al.* *J Food Sci Technol*, 1994, **31**: 320 ~ 323.
- [8] Lakshmi B S, Kanguean P, Abraham B, *et al.* *Letters in Applied Microbiology*, 1999, **29**: 66 ~ 70.
- [9] 杨学昊, 尹春华, 傅四周, 等. *中国油脂*, 2004, **29**: 29 ~ 32.
- [10] Xu Y, Wang D, Mu X Q, *et al.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2002, **18**: 29 ~ 37.
- [11] 张博润, 蔡金科, 刘永成. *微生物学通报*, 1993, **20** (6): 335 ~ 338.
- [12] McNeill G P, Shimizu S, Yamane T. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1991, **68** (1): 1 ~ 5.