

用豆粕发酵生产卡门柏青霉脂肪酶

张大皓, 李丹, 王炳武, 谭天伟

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京市生物加工过程重点实验室, 北京 100029)

摘要: 以廉价的脱脂豆粕为初始培养基和补料培养基, 采用不同流加方式, 包括间歇补料、高浓度流加和低浓度流加, 对发酵生产卡门柏青霉(*Penicillium camembertii Thom*)脂肪酶进行了研究. 在 5 L 发酵罐中不外加碳源, 以脱脂豆粕为培养基主要成分的条件下, 采用流加高浓度脱脂豆粕的方式, 发酵 99.8 h 得到 1,3-专一性脂肪酶, 最大酶活力 392 IU/mL. 由于在培养基中以脱脂豆粕代替了昂贵的霍霍巴油, 有可能大幅度降低生产成本.

关键词: 青霉; 脂肪酶; 补料发酵

中图分类号: TQ925

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2007)01-0149-03

1 前言

脂肪酶是一类分解和合成脂肪的酶, 已被广泛应用于食品加工、制药、洗涤、合成生物柴油、酯交换等许多行业^[1]. 微生物脂肪酶按其催化功能的位置专一性分为两大类^[2]: 第一类无位置专一性, 可以从 1, 2, 3 位置上催化酯键水解释放脂肪酸, 如假丝酵母脂肪酶^[3], 发酵酶活力可达 8000 IU/mL; 第二类是 1,3-专一性脂肪酶, 仅从甘油的 1,3 位置上催化酯键水解释放脂肪酸, 而发酵生产这些有位置专一性的脂肪酶的水平都较低, 例如少根根霉脂肪酶^[4]酶活在 220 IU/mL 左右. 位置专一性脂肪酶有很广泛的应用^[5].

Miranda^[6]用青霉 *Penicillium citrinum* 固态发酵生产脂肪酶, 利用工业废弃物作为培养基, 酶活力达到 5.786 IU/mL. 黄建忠等^[7]报道了高产变株扩展青霉 PF868 的产酶条件, 酶活力达到 1200 IU/mL. 李江华等^[8]研究了发酵罐中圆弧青霉产脂肪酶的条件, 在补加花生油的基础上, 酶活力达到 2000 IU/mL. 以上这些青霉脂肪酶的催化作用都不具有位置专一性, 但发酵水平比较高.

Tan 等^[9]研究了卡门柏青霉脂肪酶的特性: 对甘油三酯有 1,3 位的专一性, 耐高温, 最佳反应温度为 48 °C, 有特殊的底物专一性, 水解天然植物油的水解率达到 90%, 并且催化中短链酯合成的效果好, 适合短链香精酯的催化合成. 初步优化了各种培养基成分对卡门柏青霉脂肪酶生产的影响, 发现大多数甘油酯类碳源对产酶有抑制作用. 在 250 mL 摇瓶中以霍霍巴油作为碳源(5 g/L), 脱脂豆粕为氮源(40 g/L)生产卡门柏青霉脂肪酶, 得到较高的酶活水平(500 IU/mL). 但霍霍巴油价格昂

贵(1400 元/kg), 而且发酵液中含有酯类物质, 为脂肪酶分离提取制造困难. 本研究着重从降低成本的角度出发, 以脱脂豆粕(3 元/kg)代替霍霍巴油, 研究了青霉脂肪酶的高效生产.

2 材料和方法

2.1 菌种

卡门柏青霉(*Penicillium camembertii Thom*)为本实验室保存菌种.

2.2 培养基

斜面种子培养基: 麦芽汁 50 mL, 水 50 mL, 琼脂 2.5 g.

摇瓶种子培养基(g/L): 脱脂豆粕 40, 硫酸铵 1, 磷酸氢二钾 5. 脱脂豆粕由康明威公司惠赠, 产品规格 DP8080, 总含氮量 8%, 含水量 10%, 细度 80 目(180 μm). 脱脂豆粕中 3 种脂肪酶保守氨基酸组氨酸、甘氨酸、丝氨酸含量分别为 0.95%, 2.08% 和 2.59%. 其他氨基酸含量略.

摇瓶发酵培养基(g/L): 脱脂豆粕 40, 磷酸氢二铵 1, 磷酸氢二钾 5, Tween60 1.

发酵罐培养基(g/L): 脱脂豆粕 40, 磷酸氢二铵 1, 磷酸氢二钾 5, Tween60 1, 消泡剂 1.

2.3 摇瓶种子培养

青霉斜面种子在 28 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 长出大量菌丝后, 将其放入 4 °C 的冰箱中保存. 每次挑取 1 环菌丝到内装 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 在温度 28 °C、转速 220 r/min 下振荡培养 48 h, 作为种子液接入发酵液培养基.

收稿日期: 2006-02-27, 修回日期: 2006-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 2107600C); 国家高新技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2002AA514030); 国家“十五”科技攻关基金资助项目(编号: 2001 BA708 B02-08)

作者简介: 张大皓(1980-), 男, 辽宁省抚顺市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 谭天伟, 通讯联系人, E-mail: tantw@mail.buct.edu.cn.

2.4 摇瓶发酵培养

在无菌条件下移取 2 mL 种子液到内装 50 mL 摇瓶发酵培养基的 250 mL 锥形瓶中,在温度 28 °C、转速 220 r/min 下振荡培养,定时取样,用 2 层纱布过滤发酵液,取上清液测酶活性。

2.5 5 L 发酵罐实验

将发酵培养基按 3 L 装液量配好并装入发酵罐内,121 °C 下灭菌 30 min,冷却至 28 °C 后以 8% 接种量接种。搅拌转速 300 r/min,通风量 1 L/(min·L)。

2.6 酶活性测定

脂肪酶活性测定采用乳化系统。20 g/L 的聚乙烯醇溶液与橄榄油以体积比 3:1 混合并搅拌均匀,制成乳化液。取乳化液 5 mL,0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 4 mL (pH 7.0),发酵液滤液 1 mL(2 层纱布过滤),37 °C 反应 10 min,加 15 mL 95%(ϕ)乙醇中止反应,以酚酞作指示剂,用 0.05 mol/L NaOH 溶液滴定。在测定条件下,释放出 1 μ mol/min 脂肪酸所需的酶量定义为 1 IU。

3 结果与讨论

3.1 碳源的选择

研究各类碳源对产酶的影响,结果见表 1。在各种酯类物质中霍霍巴油对产酶有明显促进作用,其他酯类物质普遍对产酶有抑制。脂肪醇、脂肪酸和烃类物质对产酶没有明显促进作用。对照实验的培养基中没有外加碳源,只含有脱脂豆粕和无机盐,酶活也达到较高水平(220 IU/mL)。

表 1 碳源对脂肪酶生产的影响

Table 1 Effects of carbon sources on lipase production

Carbon source	Lipase activity (IU/mL)	Carbon source	Lipase activity (IU/mL)
Glycerol	222.1	Palm oil	58.6
Heranol	231.0	Peanut oil	72.2
Heptanol	232.0	Olive oil	62.0
Hexadecanol	82.71	Jojoba oil	380.0
Octadecanol	217.3	Soybean oil	157.8
Decane	160.0	Rapeseed oil	146.5
Tetradecane	202.4	Oleic acid	171.4
Hexadecane	176.0	Myristic acid	215.0
Tetracosane	190.8	Palmitic acid	221.0
Squalane	149.6	None	225.0

3.2 氮源的选择

在不加入碳源的条件下,250 mL 摇瓶中于 48 和 72 h 分别补加 1 g 脱脂豆粕、1 g 全脂豆粉和氨基酸,氮源对产酶的影响见图 1,其中氨基酸由脂肪酶氨基酸序列中已知的 3 个保守氨基酸组氨酸、甘氨酸、丝氨酸组成,其补加量与 1 g 脱脂豆粕中含有的这 3 种氨基酸的量相同。从图可见,补加了脱脂豆粕的摇瓶中酶活明显高于其他几组实验,酶活从 96 h 后迅速增长,到 120 h 达到

最高(380 IU/mL),与不补料相比提高了 52%。120 h 以后停止增长。补加全脂豆粉与空白实验的酶活相差无几。补加氨基酸的实验产酶效果不好,说明脂肪酶的生产不能简单地归结为保守序列氨基酸的作用。结果表明补加脱脂豆粕可以替代昂贵的霍霍巴油。

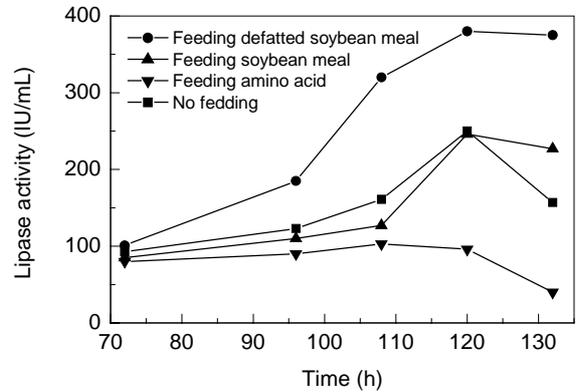


图 1 补加不同氮源对产酶的影响
Fig.1 Effect of feeding nitrogen sources on lipase activity

3.3 脱脂豆粕的补料方式

以不同的补加方式向摇瓶中补加 2 g 脱脂豆粕粉末,补加方式对产酶的影响见图 2。实验 A 和 B 中把 2 g 补加量分别集中在 0 和 48 h 一次补加,酶活一直处于较低的水平。由于在 72 h 前补加的脱脂豆粕量不同,在 72 h 时各组的酶活产生差异;实验 E 在 48 和 60 h 分 2 次补加 1 g 脱脂豆粕,在 72 h 时酶活最高达到 170 IU/mL 左右,说明初期分 2 次补加豆粕减小了底物抑制,能够在初期刺激脂肪酶的合成,但最终酶活不高。实验 C 和 D 的最终酶活水平比其他几组高,达到 380 IU/mL 左右。

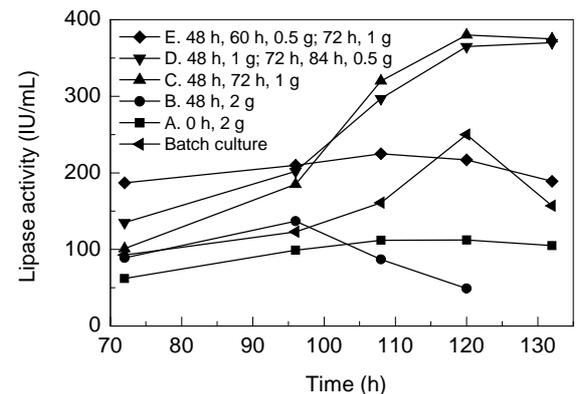


图 2 脱脂豆粕不同补加方式对产酶的影响
Fig.2 Effect of feeding means on lipase activity

3.4 脱脂豆粕的流加

按最优补料方案,在 5 L 发酵罐中设计 2 组脱脂豆粕流加实验。图 3 为在 48~115 h 间接近匀速流加含 120 g/L 的脱脂豆粕的补料液 1 L 的实验结果。在 99.8 h 达到

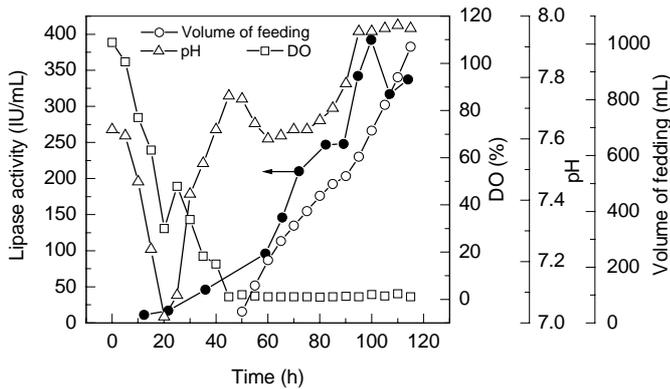


图 3 流加高浓度豆粕的发酵曲线

Fig.3 Fed-batch fermentation fed with high concentration of defatted soybean meal

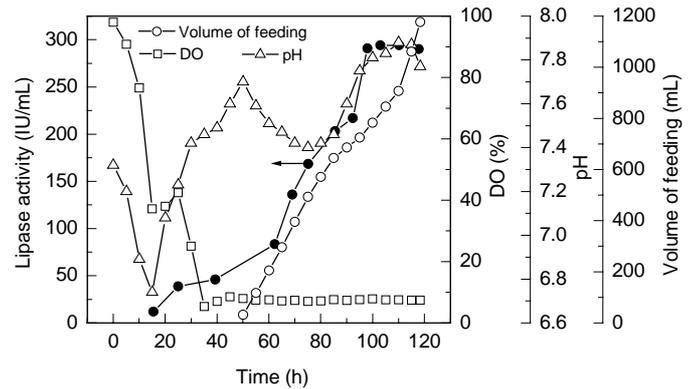


图 4 流加低浓度豆粕的发酵曲线

Fig.4 Fed-batch fermentation fed with low concentration of defatted soybean meal

最高酶活 392 IU/mL. 图 4 是 48~118 h 间流加含 80 g/L 脱脂豆粕的补料液 1 L 的实验结果, 酶活在 100 h 左右达到最高值 294 IU/mL. 比较图 3 和 4 可知, 低浓度匀速流加也提高了酶活, 但流加的脱脂豆粕总量不够, 产酶效果没有高浓度流加好.

4 结论

(1) 在不外加碳源的情况下, 以脱脂豆粕为主要培养基成分的空白实验产酶较高(220 IU/mL), 而且在此基础上补加脱脂豆粕, 产酶水平达到了以霍霍巴油为碳源的产酶水平(380 IU/mL), 说明可以用补加脱脂豆粕代替霍霍巴油.

(2) 装液量为 2 L 的 5 L 发酵罐中不外加碳源, 培养基浓度为(g/L): 脱脂豆粕 40, 磷酸氢二铵 1, 磷酸氢二钾 5, Tween60 1, 消泡剂 1. 当 pH 值回升到 7.74 时开始流加 120 g/L 脱脂豆粕 1 L, 可得较高酶活.

参考文献:

[1] Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, Purification,

Characterization, and Applications of Lipases [J]. *Biotechnol. Adv.*, 2001, 19: 627-662.

- [2] 杨学昊, 谭天伟. 固定化根霉发酵生产脂肪酶 [J]. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 284-286.
- [3] 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.
- [4] Yang X H, Wang B W, Cui F N, et al. Production of Lipase by Repeated Batch Fermentation with Immobilized *Rhizopus arrhizus* [J]. *Process Biochem.*, 2005, 40(6): 2095-2103.
- [5] Tan T W, Tin C H. The Mechanism and Kinetic Model for Glycerolysis by 1,3 Position Specific Lipase from *Rhizopus arrhizus* [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2005, 25(1): 39-45.
- [6] Miranda O A. Lipase Production by a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum* Using an Industrial Residue [J]. *Bioresour. Technol.*, 1999, 69(2): 145-151.
- [7] 黄建忠, 施巧琴, 郑毅, 等. 中温碱性脂肪酶的研究: II. 扩展青霉 PF868 变株产酶条件 [J]. *工业微生物*, 1995, 25(4): 10-14.
- [8] 李江华, 郭敏辰. 圆弧青霉产碱性脂肪酶的中试发酵 [J]. *无锡轻工大学学报*, 2002, (3): 2-6.
- [9] Tan T W, Zhang M, Xu J L, et al. Optimization of Culture Conditions and Properties of Lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3 [J]. *Process Biochem.*, 2004, 39(11): 1495-1502.

Production of Lipase by *Penicillium camembertii* Thom in Fermentation with Defatted Soybean Meal

ZHANG Da-hao, LI Dan, WANG Bing-wu, TAN Tian-wei

(*Col. Life Sci. & Technol., Beijing University of Chemical Technology, Key Lab Bioprocess Beijing, Beijing 100029, China*)

Abstract: Fed-batch fermentation with *Penicillium camembertii* Thom by feeding defatted soybean meal to produce lipase was studied. The effect of several feeding strategies including batch feeding, both high and low concentration feeding on lipase production was investigated. The highest lipase activity of 392 IU/mL was achieved by feeding high concentration defatted soybean meal in a 5 L fermentor after 99.8 h of the cultivation, no other carbon source was added in the cultivation. The cost of the lipase production was remarkably reduced using this feeding strategy due to the absence of jojoba oil in the culture medium.

Key words: *Penicillium camembertii* Thom; lipase; fed-batch fermentation