

根霉 ZM-10 产脂肪酶发酵条件的研究

李 燕¹, 连 毅², 陈义伦³, 徐 静¹

(1.浙江省温州市农业科学研究院食品所, 浙江 温州 325006; 2.温州医学院第二临床医学院, 浙江 温州 325035; 3.山东农业大学食品学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 通过对从酒厂筛选出的 1 株根霉 *Rhizopus* ZM-10 产脂肪酶发酵条件的研究, 得到较优培养基配方为: 蔗糖 3%、蛋白胨 1%、豆饼粉 3%, 初始 pH 8.0, 产酶的最适温度为 30℃, 培养周期为 72 h。在此条件下所得的脂肪酶, 在有机相中催化己酸乙酯的作用显著提高。

关键词: 根霉; 脂肪酶; 发酵条件; 有机相; 合成转化率

中图分类号: TS261.4 Q93-3

文献标识码: B

文章编号: 1001-9286(2009)03-0079-03

Study on the Fermentation Conditions of *Rhizopus* ZM-10 to Produce Lipase

LI Yan¹, LIAN Yi², CHEN Yi-lun³ and XU Jing¹

(1. Wenzhou Academy of Agricultural Science, Wenzhou Zhejiang, 325006; 2. The Second Clinical Medical College of Wenzhou Medical College, Wenzhou Zhejiang, 325035; 3. College of Food Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: A *rhizopus* strain ZM-10 was screened from liquor-making plant. The fermentation conditions of strain ZM-10 to produce lipase were studied. The optimum fermentation conditions were summed up as follows: the use level of sucrose, peptone and bean powder were 3%, 1% and 2% respectively, the initial pH value was 8.0, the fermentation temperature was at 30℃, and the fermentation period was 72 h. Under such conditions, the esterification conversion rate of ethyl hexanoate enhanced remarkably in non-aqueous medium.

Key words: *Rhizopus*; lipase; fermentation conditions; non-aqueous medium; esterification conversion rate

脂肪酶(Lipase E.C.3.1.1.3)是一类特殊的酯键水解酶, 它作为生物催化剂可催化由不同底物出发的水解和合成反应^[1]。近年来, 脂肪酶已广泛应用于有机合成、食品、药品、化妆品等行业^[2], 特别是在风味酯行业的应用, 促进了脂肪酶研究的飞速发展^[3~5]。

自然界中能产生脂肪酶的微生物资源丰富, 从分类上看主要是真菌, 真菌中主要有青霉、根霉、红曲霉、黑曲霉等; 其次是细菌, 放线菌中也有个别种类也能产生一定量的脂肪酶^[6]。但是, 应用于工业生产的脂肪酶并不多, 特别是由于传统的研究皆以分解酶活为指标进行筛选的, 因此适用于短碳链酯合成的脂肪酶更是相对缺乏^[7]。

以脂肪酶有机相合成能力为终指标, 从酒厂分离到 1 株合成己酸乙酯转化率相对较高的根霉。本实验室以该菌为出发菌, 较为系统地研究了其产酶条件, 为工业化生产提供了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种

根霉 ZM-10, 本实验室选育菌种。

收稿日期: 2008-11-06

作者简介: 李燕(1981-), 女, 硕士, 主要从事食品发酵及营养方面的研究。

通讯作者: 徐静(1964-), 女, 副教授, 主要从事食品安全方向的研究。

1.1.2 主要仪器和设备

HH-B11-500 电热恒温培养箱 (上海市跃进医疗器械一厂); SW-CJ-IF 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); ZD-85A 气浴恒温振荡器 (常州澳华仪器有限公司); QL-901 涡旋器 (其林贝尔仪器制造公司); YXQG02 电热式蒸汽消毒器 (山东新华医疗器械厂); ALPHAI-5 真空冷冻干燥仪 (德国)。

1.1.3 主要试剂

正己酸 (国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇 (天津永大化学试剂开发中心); 环己烷 (天津恒兴化学试剂制造有限公司), 以上试剂均为分析纯。

1.1.4 培养基

斜面培养基: 麸皮汁蔗糖培养基。

发酵培养基: 添加蔗糖 3.0%, 豆饼粉 2.5%, 蛋白胨 1.0%。

发酵培养: 菌种在麸皮汁蔗糖斜面培养基上培养 3 d, 用无菌水洗下孢子, 稀释孢子悬浮液到每毫升含 $10^5 \sim 10^6$ 个孢子。取 1 mL 孢子悬浮液接种到 50 mL 液态发酵培养基中 (250 mL 三角瓶), 在 35℃、150 r/min 条件

下振荡培养 72 h。

1.2 方法

1.2.1 全细胞脂肪酶的制备

过滤菌丝体,用去离子水洗去发酵残留物,冰冻后在真空冷冻干燥机中冻干。在冰浴中用研钵将菌丝体磨成粉状,于冰箱中 4℃ 保存。

1.2.2 己酸乙酯合成转化率的计算

将摩尔浓度比为 1:1.3 的己酸和无水乙醇溶于环己烷,制备己酸浓度为 0.2 mol/L 的反应底物。取 5 mL 反应底物于 100 mL 具塞三角瓶中,加入 0.4 g 脂肪酶,在 40℃ 及 150 r/min 下振荡反应 14 h,加入 10 mL 95% vol 乙醇中止反应。同时做空白对照^[8]。在测定条件下过滤反应液,取出 5.0 mL,加一滴酚酞作指示剂,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液滴定,所消耗的氢氧化钠体积为 V_1 。移取同样中止反应的未加酶的反应溶液 5.0 mL,同样测定空白值 V_0 。则转化率为:

$$\text{酯合成转化率} = (V_0 - V_1) / V_0 \times 100\%$$

1.2.3 气相色谱验证己酸乙酯的生成

用 30 m 长的 SE-30 毛细管柱,氢火焰检测器,柱前压为 0.04 MPa,氢气 30 mL/min,氮气为载气,柱温条件为:50℃,3 min,10℃/min 至 180℃,保持 2 min。外标法检测己酸乙酯的含量。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件对产酶的影响

2.1.1 不同培养时间对产酶的影响

将接种后的发酵培养基在 35℃ 及 150 r/min 条件下,发酵培养 60 h、72 h 和 84 h 等不同时间。测定其在有机相中催化合成己酸乙酯的转化率,观察培养不同时间所得的脂肪酶,其合成己酸乙酯的转化率随时间变化的情况。培养时间对产酶影响的结果见图 1。

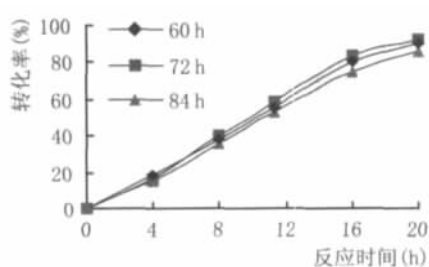


图1 培养时间对产酶的影响

由图 1 可以看出,随着反应时间的延长,脂肪酶催化合成己酸乙酯的转化率是逐渐增大的,前 4 h 发酵培养 60 h 的根霉所产脂肪酶的转化率大于培养 72 h 和 84 h 的脂肪酶,但 8 h 以后,培养 72 h 的根霉脂肪酶的转化率最大。

2.1.2 不同培养温度对产酶的影响

将接种后的发酵培养基在 30℃、35℃ 和 40℃ 等不

同温度下,150 r/min 发酵培养 72 h。测定其有机相中合成己酸乙酯的转化率,观察在不同温度下培养所得的脂肪酶,转化率随时间变化的情况。结果见图 2。

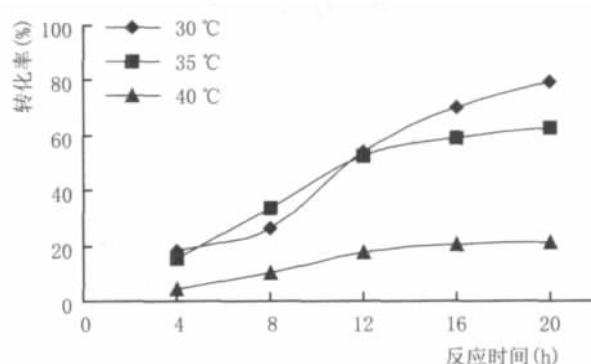


图2 培养温度对脂肪酶活力的影响

由图 2 可看出,在 12 h 前,35℃ 培养的脂肪酶催化合成己酸乙酯的转化率大于 30℃ 培养时的脂肪酶,但 12 h 以后,30℃ 培养的脂肪酶合成转化率则较大,40℃ 培养的脂肪酶的合成转化率一直远低于 30℃ 和 35℃ 培养的脂肪酶。这是因为脂肪酶长时间置于较高温度下,酶的稳定性受到破坏。

2.1.3 不同 pH 对产酶的影响

分别用 1.0 mol/L HCl 和 1.0 mol/L NaOH 调节发酵培养基的初始 pH 为 6.0、7.0、7.5、8.0 和 8.5,30℃ 培养 72 h,测所得脂肪酶在 14 h 的合成转化率。结果见图 3。

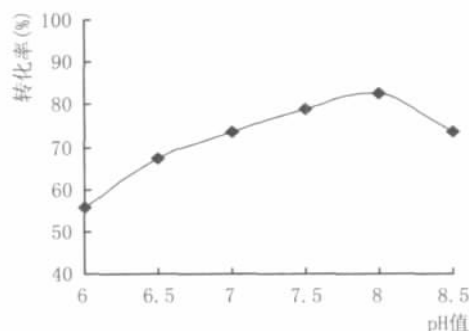


图3 初始 pH 对产酶的影响

由图 3 可知,发酵液初始 pH 为 8.0 时,酶的转化率最高。当 pH 较低时,菌体生长迟缓,菌体量较小,合成转化率也较低。

2.1.4 根霉产脂肪酶培养条件的优化

根据单因素实验结果,设计了 3 因素 3 水平的正交分析表,确定根霉产脂肪酶培养条件的最佳因素水平组合。正交实验的因素和水平设计见表 1,正交实验结果见表 2。

表1 正交实验的因素和水平

水平	A (培养温度,℃)	B (培养时间,h)	C (初始 pH)
1	60	30	7.5
2	72	35	8.0
3	84	40	8.5

从表 2 中可看出, R 值可以得到各因素对产酶的影响, 其影响能力大小为: 培养温度 > 初始 pH > 培养时间。因此, 可以确定该菌株培养条件的最佳组合为: 在初始 pH 为 8.0、温度为 30 ℃ 条件下培养 72 h。在此条件下产酶, 菌体总合成转化率最大。

2.2 不同碳源对产酶的影响

以发酵培养基为基础, 用各种碳源代替其中的蔗糖, 于 30 ℃ 培养 72 h, 测定其菌体重量及转化率, 对照样为

不加碳源, 结果见表 3。

从表 3 可看出, 添加 3 % 蔗糖的菌体总合成转化率最大(菌体总合成转化率为菌体量和转化率的乘积)。

2.3 不同氮源对产酶的影响

2.3.1 单一氮源对产酶的影响

以发酵培养基为基础碳源, 蔗糖添加量为 3 %, 均分别以所选氮源代替原发酵液中的黄豆粉和蛋白胨, 按含氮量 0.3 %、0.6 % 和 0.9 % 3 个水平添加, 结果见表 4。由

表 4 可看出, 添加无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NaNO_3 等, 菌体根本不生长或生长及微弱, 同时可看出加豆饼粉和蛋白胨复合氮源的菌体总合成转化率大于单一的豆粉氮源。

2.3.2 复合氮源对产酶的影响

根据单一氮源实验, 选取豆粉和蛋白胨为氮源, 将含氮量折算成豆粉和蛋白胨的质量分数, 对其不同配比进行实验, 结果见表 5。

表 5 表明, 当蛋白胨为 1 %、豆饼粉为 3 % 时, 菌体的总合成转化率最大。

3 结论

对根霉 SE-10 产脂肪酶的培养基成分和培养条件进行了优化, 结果表明, 其培养基成分为蔗糖 3 %、蛋白胨 1 %、豆饼粉 3 %, 初始 pH 为 8.0, 培养温度为 30 ℃, 培养周期为 72 h 时, 所得菌体的总合成转化率最大。

参考文献:

- [1] 李香春, 甄宗园. 脂肪酶特性及其应用[J]. 粮食与油脂, 2003, (3): 19
- [2] Jaeger K E, Eggert T. Lipase for biotechnology[J]. Curr Opin Biotechnol, 2002, 13: 390-397.
- [3] 徐岩, 章克昌, 王亚非. 微生物脂肪酶在正庚烷中合成短链芳香酯的研究[J]. 生物工程学报, 1998, 14(2): 214-217.
- [4] Short chain fatty acid esters synthesis by commercial lipases in low-water systems and by resting microbial cells in aqueous medium [J]. Biotechnolohy Letters, 1998, 20(12): 1127-1131.
- [5] S Hari Krishna, SG Prapulla, NG Karanth. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate using immobilized Rhizomucor miehei lipase in non-aqueous media[J]. Journal of Industry Microbiology & Biotechnology, 2000, (25): 147-154.
- [6] 施安辉, 周波. 酯酶的微生物类群及其应用前景[J]. 中国酿造, 2002, 122(6): 14-16.
- [7] 徐岩, 谢红想, 王栋等. 一株根霉产脂肪酶发酵条件的研究[J]. 工业微生物, 1999, 29(1): 6-9.
- [8] 颜兴和, 王栋, 徐岩. 华根霉脂肪酶有机相合成酶活的研究[J]. 工业微生物, 2005, 35(2): 24-27.

表 2 正交实验结果

序号	A(培养温度, ℃)	B(培养时间, h)	C(初始 pH)	14 h 合成转化率(%)	菌体量(g/100 mL)	菌体总合成转化率(%)
1	1	1	1	72.8	1.49	108.47
2	1	2	2	78.2	1.79	139.98
3	1	3	3	65.3	1.51	98.60
4	2	1	2	74.3	1.41	104.76
5	2	2	3	58.4	1.34	78.26
6	2	3	1	42.5	1.25	53.13
7	3	1	3	4.20	1.01	4.24
8	3	2	1	7.62	0.95	7.24
9	3	3	2	1.20	0.59	0.71
K_1	347.05	217.47	168.84			
K_2	236.15	225.48	245.45			
K_3	12.19	152.44	181.10			
R	334.86	73.04	76.61			$R_A > R_C > R_B$

表 3 碳源对产酶的影响

碳源浓度	碳源添加量 1 %		碳源添加量 3 %		碳源添加量 5 %	
	转化率(%)	菌体量(g/100 mL)	转化率(%)	菌体量(g/100 mL)	转化率(%)	菌体量(g/100 mL)
可溶性淀粉	30.9	0.80	34.0	0.85	30.7	1.12
玉米粉	—	—	—	少量	42.6	1.33
蔗糖	84.1	1.20	86.7	2.04	75.4	2.26
葡萄糖	85.6	1.32	64.1	1.68	40.9	1.44
麦芽糖	—	极少量	67.6	0.28	88.8	0.80
对照	—	—	—	—	—	—

表 4 单一氮源对产酶的影响

氮源浓度	氮源添加量 0.3 %		氮源添加量 0.6 %		氮源添加量 0.9 %	
	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)
豆粉	70.7	2.86	86.7	0.90	90.5	0.72
蛋白胨	—	—	—	—	—	—
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	—	—	—	—	—
NaNO_3	—	—	—	—	—	—
混合氮源	72.5	3.54	88.2	1.20	91.2	1.02

表 5 复合氮源对产酶的影响

豆粉(%)	蛋白胨 0.5 %		蛋白胨 1.0 %		蛋白胨 2.0 %	
	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)	转化率(%)	菌丝体(g/100 mL)
1.0	93.2	1.28	—	0.98	—	几乎无
2.0	92.1	1.52	84.2	2.34	—	少量
3.0	91.6	2.28	90.7	2.42	87.6	1.42