

假丝酵母 *Candida* sp. 发酵生产脂肪酶培养条件的优化

郑美玲, 林玲玲, 杨海龙[†]

(温州大学生命与环境科学学院, 浙江温州 325027)

摘要: 研究了碳源和氮源种类、碳源浓度以及起始 pH 值对假丝酵母 *Candida* sp. 菌株发酵生产脂肪酶的影响. 结果显示, 最适碳源为橄榄油, 氮源为酵母膏, 橄榄油浓度为 2%, 起始 pH 值为 6.0. 应用响应面设计对酵母膏、橄榄油和起始 pH 值进行培养基优化, 结果表明, 优化后的培养基配方为: 橄榄油 2.582%, 酵母膏 0.276%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, NaCl 0.05%, pH6.28. 在此条件下, 假丝酵母 *Candida* sp. 液体发酵液中脂肪酶的酶活力可达 $36\ 250\ U \cdot mL^{-1}$.

关键词: 脂肪酶; 假丝酵母; 响应面分析; 发酵

中图分类号: TQ925 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-0375(2008)05-0030-06

脂肪酶 (Lipase, EC3.1.1.3) 又称三酰基甘油水解酶, 广泛存在于动物组织、植物种子和微生物体中, 是一类水解和合成长链脂肪酸甘油酯的生物催化剂, 在油脂加工、洗涤、食品加工、医药、化妆业、皮革加工、饲料、造纸、有机合成、精细化工以及生物能源等诸多领域有着广泛的应用^[1]. 对高产脂肪酶菌株的选育及其发酵条件的研究一直受到工业微生物学者的关注, 研究报道的菌株包括假单胞菌^[2]、丝孢酵母^[3]、假丝酵母^[4]、白地霉^[5-6]、米曲霉^[7]、少根根霉^[8]等.

对微生物发酵条件的研究, 普遍采用的方法为单因素试验, 或是在单因素试验的基础上采用正交试验, 但该方法难于全面考察各因素间的相互作用. 响应面方法 (Response surface methodology, RSM) 在多因子起作用的生化过程中, 可以快速地找出主要因子, 逼近最大响应区间, 获得最佳操作条件, 已广泛应用于多因素影响条件的优化^[9]. 本文对假丝酵母 *Candida* sp. 菌株产脂肪酶培养基组成及 pH 进行了初步研究, 以期对脂肪酶的发酵生产提供基础.

1 材料与方法

1.1 菌种

假丝酵母 *Candida* sp.: 从浙江温州仰义皮革基地土壤中筛选获得.

1.2 培养基

种子培养基 ($g \cdot L^{-1}$): 酵母膏 2, 橄榄油 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NaCl 0.5.

初始发酵培养基 ($g \cdot L^{-1}$): 蛋白胨 2, 葡萄糖 5, K_2HPO_4 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NaCl 0.5.

收稿日期: 2008-04-02

基金项目: 温州市龙湾区科技计划项目(2005N8Z)

作者简介: 郑美玲(1984-), 女, 浙江丽水人, 学士, 研究方向: 生物技术. [†] 通讯作者, yhl@wzu.edu.cn

1.3 发酵培养

将活化 24h 后的种子培养液以体积分数 10% 的接种量接种至发酵培养基中, 一定条件下摇床培养. 培养液 8 000r/min 离心 10min, 取上清发酵液测定脂肪酶活力.

1.4 酶活力测定^[10]

橄榄油乳化滴定法. 以橄榄油为底物, 1mL 酶液在 0.05mol·L⁻¹、pH 值为 10.30 的甘氨酸-NaOH 缓冲液中, 温度 37℃. 在上述条件下, 以每 min 产生 1nmol 脂肪酸的酶量定为一个脂肪酶活力单位.

1.5 响应面分析 (RSM) 优化培养基组成

响应面分析 (RSM) 法是一种寻找多因素系统中最佳条件的数学统计方法. 根据 Box-Bohnken 中心组合原理, 设计三个因素取三个水平共 15 个试验点的响应面分析, 根据相应的试验表进行试验后, 试验数据用 SAS6.12 软件经多项式回归分析, 得到一个关于响应值与自变量关系的二阶经验模型:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

式中 Y 为预测响应值即菌株产酶活力, β 为回归系数, 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 为影响菌株产酶的主要因素. 用 SAS6.12 软件对试验数据做回归拟合, 并对拟合方程做显著性检验及方差分析. 多项式模型拟合的性质由决定系数 R^2 及方差分析决定; 其统计学上的显著性由 F 检验确定. 通过分析各因素的主效应和交互效应, 最后确定在一定水平范围内求取最佳值.

2 结果与分析

2.1 不同碳源对脂肪酶生产的影响

改变初始发酵培养基中碳源的种类, 分别以 0.5% 的葡萄糖、橄榄油、玉米油、麦芽糖、蔗糖作为唯一的碳源, 摇床培养 72h, 测定 *Candida sp.* 菌产脂肪酶发酵液酶活. 结果 (图 1) 显示, 以葡萄糖等糖类物质为碳源时发酵酶活较低, 以油脂为碳源有利于脂肪酶生产, 油脂除作为碳源外, 显然还对脂肪酶的形成具有诱导作用, 但油脂的种类 (橄榄油、玉米油) 对脂肪酶生产影响不大, 其中橄榄油为碳源时产酶活力稍高, 达 2 326U·mL⁻¹.

2.2 不同氮源对脂肪酶生产的影响

以 0.5% 的橄榄油为碳源, 改变发酵培养基中氮源的种类, 分别以 0.2% 的蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、硫酸铵、硝酸钠作唯一的氮源, 摇床培养 72h, 测定 *Candida sp.* 菌发酵液酶活, 结果 (图 2) 显示, 有机氮源有利于脂肪酶的生产, 其中以酵母膏的效果为最佳, 达 2 834U·mL⁻¹.

2.3 不同橄榄油含量对脂肪酶生产的影响

以 0.2% 的酵母膏为氮源, 改变发酵培养基中橄榄油的含量, 分别以浓度为 0.5%、1%、1.5%、2.0%、2.5% 作为唯一

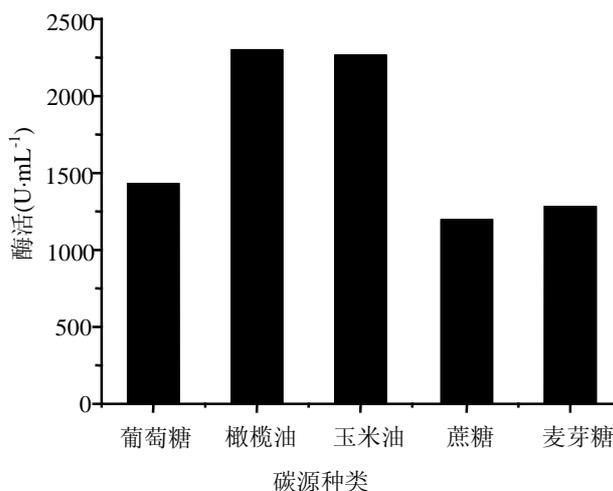


图 1 不同碳源对 *Candida sp.* 产脂肪酶的影响

Fig 1 Effects of Various Carbon Sources on the Lipase Production by *Candida sp.*

的碳源, 摇床培养 72h, 考察橄榄油添加量对 *Candida sp.* 菌发酵产脂肪酶的影响, 结果见表 1.

表1 不同橄榄油含量对 *Candida sp.* 产脂肪酶的影响

Table 1 Effect of Olive Oil Concentrations on the Lipase Production by *Candida sp.*

橄榄油浓度(%)	0.5	1	1.5	2	2.5
酶活(U·mL ⁻¹)	2 834	2 997	4 455	7 045	2 997

从表 1 中可以得出, 随着橄榄油用量的增加, *Candida sp.* 发酵液的酶活逐渐增加. 当橄榄油用量增加到 2%, *Candida sp.* 产脂肪酶的酶活有一个明显的跳跃, 此时酶活最大, 达 7 045 U·mL⁻¹; 但随着橄榄油用量的增加, 酶活呈现下降.

2.4 不同起始 pH 值对脂肪酶生产的影响

以 0.2% 的酵母膏为氮源, 以 2% 的橄榄油为碳源, 改变发酵培养基中起始 pH 值, 分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 下进行产酶试验, 摇床培养 72h. 测定发酵液中产脂肪酶的酶活, 试验结果(图 3)表明, 起始 pH 值会直接影响到 *Candida sp.* 产脂肪酶的酶活, 在 pH 值为 6.0 时, 酶活达到最高点, 此时产酶酶活为 14 023 U·mL⁻¹.

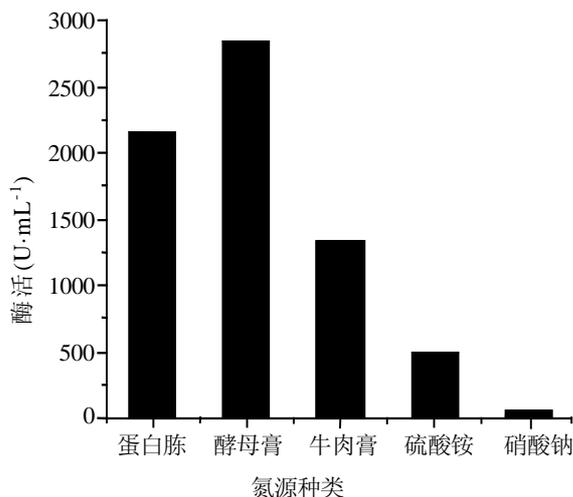


图2 不同氮源对 *Candida sp.* 产脂肪酶的影响

Fig 2 Effects of Various Nitrogen Sources on the Lipase Production by *Candida sp.*

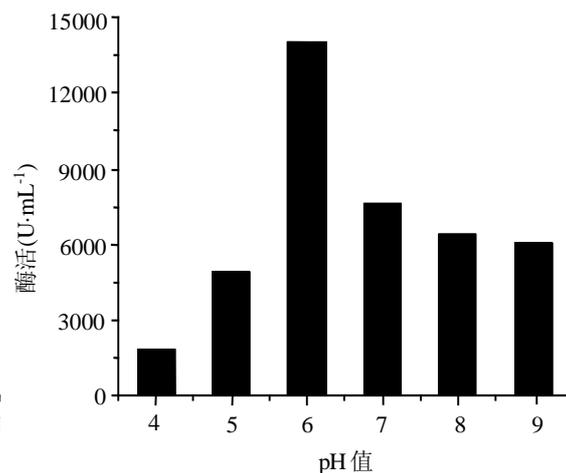


图3 不同起始 pH 值对 *Candida sp.* 产脂肪酶的影响

Fig 3 Effects of Initial pH on the Lipase Production by *Candida sp.*

2.5 响应面分析优化产酶条件

从以上试验结果可知, 碳、氮源的种类及其浓度、起始 pH 值对 *Candida sp.* 菌株产脂肪酶影响较大. 为确定菌株产脂肪酶的最佳橄榄油、酵母膏添加量以及最佳起始 pH 值, 采用 Box-Behnken 的中心组合设计进行优化, 其中三个试验因素与水平的选取见表 2, 试验结果及方差分析分别见表 3、表 4.

表2 响应面分析因素与水平

Table 2 Analytical Factors and Levels for RSM

水平	酵母膏(X ₁)	橄榄油(X ₂)	pH(X ₃)
-1	0.1%	1%	5.0
0	0.2%	2.0%	6.0
1	0.3%	3%	7.0

表3 响应面试验设计与结果

Table 3 Experimental Design and Result of RSM Design

RUN	酵母膏 X_1	橄榄油 X_2	pH X_3	酶活 $Y(U \cdot mL^{-1})$
1	-1	-1	0	9 346
2	-1	1	0	12 480
3	1	-1	0	35 880
4	1	1	0	45 240
5	0	-1	-1	9 346
6	0	-1	1	17 160
7	0	1	-1	23 400
8	0	1	1	42 120
9	-1	0	-1	10 920
10	1	0	-1	29 640
11	-1	0	1	3 120
12	1	0	1	35 880
13	0	0	0	14 020
14	0	0	0	14 019
15	0	0	0	14 021

表4 回归方程的方差

Table 4 ANOVA for Y

Source	DF	SS	MS	F	Pr>F
X_1	1	1.533 9E9	1.533 9E9	39.491	0.001 5
X_2	1	3.316 3E8	3.316 3E8	8.538 2	0.032 9
X_3	1	77 962 585	77 962 585	2.007 2	0.215 7
$X_1 * X_1$	1	68 270 769	68 270 769	1.757 7	0.242 2
$X_1 * X_2$	1	9 690 769	9 690 769	0.249 4	0.638 6
$X_1 * X_3$	1	49 280 400	49 280 400	1.268 8	0.311 1
$X_2 * X_2$	1	2.030 9E8	2.030 9E8	5.228 8	0.070 9
$X_2 * X_3$	1	29 735 209	29 735 209	0.765 5	0.421 6
$X_3 * X_3$	1	9 101 169	9 101 169	0.234 3	0.648 7
Model	9	2.288 9E8	2.543 3E8	6.547 843	0.026 1
R^2	0.9218				

将试验数据运用SAS进行回归拟合, 可得酶活力响应值 (Y) 与各因子 (X_1 , X_2 , X_3) 之间的回归方程为:

$$Y_1 = 14\,020 + 13\,846.75X_1 + 6\,438.5X_2 + 3\,121.75X_3 + 4\,300X_1^2 + 7\,416.5X_2^2 + 1\,570X_3^2 + 1556.5X_1X_2 + 3\,510X_1X_3 + 2\,726.5X_2X_3$$

由方差分析(表4)可知, 大于F值的概率为0.026 1, 说明该模型可靠性较高. 此外, 其中复相关系数的平方 $R^2=0.921 8$, 说明由这3个因素及其二次项能解释 Y_1 的变化的92.18%, 回归方程的模型拟合程度较好^[11-12].

响应面图形是响应值对各试验因子 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维空间的曲面图, 从响应面分析图上可以形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用. 当特征值均为正值时, 响应面分析图如山

谷形曲面,有极小值存在;当特征值为负值时,为山丘曲面,有极大值存在;当特征值有正有负时,为马鞍形曲面,没有极值存在^[13].根据回归方程,作出不同因子的响应面分析的立体图以及相应的等高图,见图4、图5、图6.

经典型分析,3个特征值有正有负,说明二次响应面为马鞍形,故无极值存在.经进一步做岭脊分析表明最佳培养基组成为:酵母膏0.276 2%,橄榄油2.582%,pH值6.28,理论上所测的酶活为 $36\ 240.76\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,略高于中心组合试验的第12组试验.对回归方程的优化结果进行试验论证.根据实际情况,取酵母膏0.28%,橄榄油2.58%,pH值6.28,脂肪酶的实际酶活为 $36\ 250\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,与预测值相差不大,说明回归模型可较好地预测酶活大小.

假丝酵母具有较强的脂肪酶生产能力,Muralidhar等以*Candida cylindracea* NRRL Y-17506发酵生产脂肪酶,经优化后,以橄榄油为碳源,在中试规模发酵,酶活力为 $47.25\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[4];何耀强等以假丝酵母99-125进行脂肪酶的发酵生产,在30L发酵罐发酵酶活达 $8\ 100\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[9].本文对假丝酵母*Candida sp.*发酵生产脂肪酶的条件进行了研究,经优化后在摇瓶发酵水平发酵酶活达 $36\ 250\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3 结 论

以假丝酵母*Candida sp.*为出发菌株,对其产脂肪酶的发酵条件进行了研究,结果表明:

(1) 橄榄油是适宜的碳源,酵母膏是适宜的氮源,最适pH值在6.0左右;

(2) 经响应面分析法优化,假丝酵母*Candida sp.*产脂肪酶的发酵培养基组成为(%):酵母膏 0.276 2%,橄榄油 2.582%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

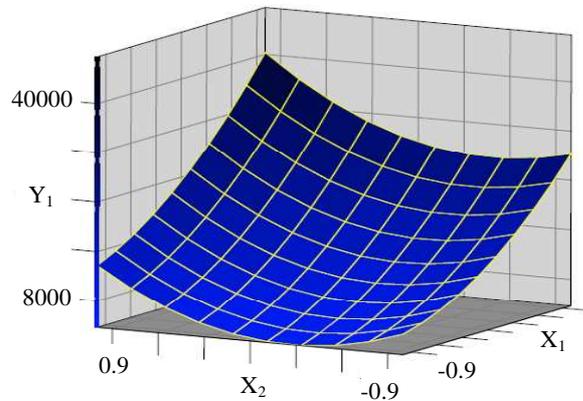


图4 X_1 和 X_2 对*Candida sp.*产酶影响的响应面图和等高图
Fig 4 Response Surface and Contour Plots for the Effect of *Candida sp.* Lipase Production between X_1 and X_2

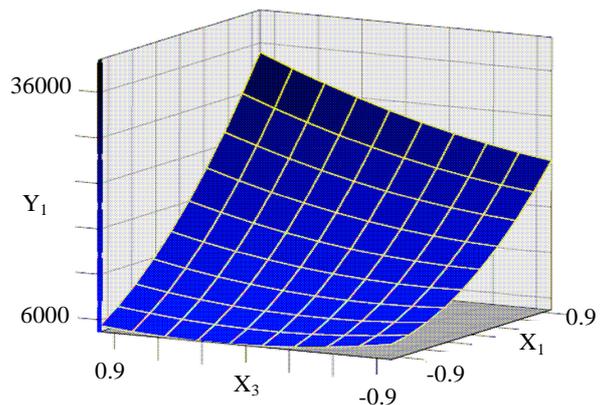


图5 X_1 和 X_3 对*Candida sp.*产酶影响的响应面图和等高图
Fig 5 Response Surface and Contour Plots for the Effect of *Candida sp.* Lipase Production between X_1 and X_3

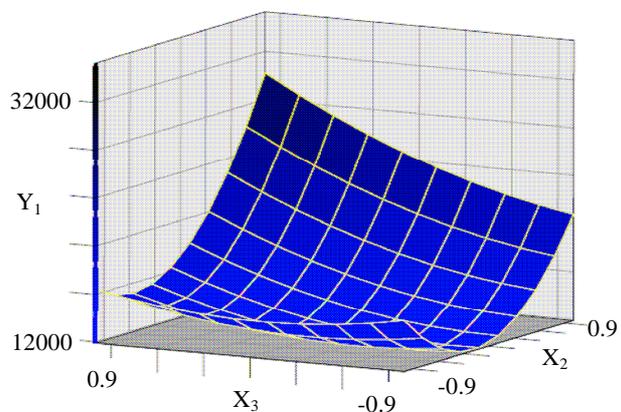


图6 X_2 和 X_3 对*Candida sp.*产酶影响的响应面图和等高图
Fig 6 Response Surface and Contour Plots for the Effect of *Candida sp.* Lipase Production between X_2 and X_3

0.01%, NaCl 0.05%, pH 值为 6.28; 在此条件下, 脂肪酶发酵酶活达 36 250 U mL⁻¹.

参考文献

- [1] Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, characterization, and applications of lipases [J]. *Biotechnology Advances*, 2001, 19: 627-662.
- [2] 高修功, 章克昌, 曹淑桂. 脂肪酶产生菌的选育及产酶条件的优化[J]. *微生物学报*, 1998, 38(4): 313-317.
- [3] 宋欣, 魏留梅, 刘瑞田, 等. 脂肪酶高产菌株选育和菌种库的建立[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(1): 6-10.
- [4] Muralidhar R V, Chirumamila R R, Marchant R, et al. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2001, 9: 17-23.
- [5] 阎金勇, 杨江科, 闫云君. 单因子-响应面法优化白地霉 Y162 产脂肪酶条件[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(8): 69-74.
- [6] Burkert J F M, Maugeri F, Rodrigues M I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 91: 77-84.
- [7] 王小花, 洪枫, 朱利, 等. 米曲霉产胞外脂肪酶培养条件的优化[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(4): 25-28.
- [8] Elibol M, Ozer D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus* [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 38: 367-372.
- [9] 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): 99-125.
- [10] 秦日方. 碱性脂肪酶测定方法的探讨[J]. *无锡轻工大学学报*, 1998, 17(1): 82-85.
- [11] 庄绪亮, 张洪勋. 乳链菌肽发酵的主要影响因子[J]. *化工冶金*, 2000, 21(1): 93-97.
- [12] Kylä-Nikkilä K, Hujanen M, Leisola M, et al. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(9): 3835-3841.
- [13] Gupta S, Manohar C S. An improved response surface method for the determination of failure probability and importance measures [J]. *Structural Safety*, 2004, 26: 123-139.

Optimization of Lipase Production by *Candida* sp.

ZHENG Meiling, LIN Lingling, YANG Hailong

(College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou, China 325027)

Abstract: Effects of carbon and nitrogen sources, the carbon concentration and pH on the lipase production of *Candida* sp. are studied. The results show that the best carbon source, nitrogen sources, olive oil concentration and initial pH are olive oil, yeast extract, 2%, and 6.0 respectively. The medium composition for lipase production by *Candida* sp. is optimized by response surface analysis and the result is: olive oil: 2.582%; yeast extract: 0.276%; K₂HPO₄: 0.1%; MgSO₄·7H₂O: 0.01%; NaCl: 0.05%, and initial pH: 6.28. 36 250 U·mL⁻¹ lipase can be achieved in the optimal media.

Key words: Lipase; *Candida* sp.; Response surface analysis; Fermentation

(编辑: 王一芳)