

# 微生物发酵生产脂肪酶的研究进展

汪小锋 王俊 杨江科 闫云君

(华中科技大学生命科学技术学院, 武汉 430074)

**摘 要:** 脂肪酶是一种重要的工业用酶, 广泛应用于食品、精细化工、医药和能源等领域。脂肪酶最主要的来源是通过微生物发酵生产。综述了脂肪酶种类、高产脂肪酶菌种选育、发酵工艺优化与调控、高密度发酵和发酵工艺放大等方面的研究进展, 并展望了脂肪酶发酵生产的研究方向及前景。

**关键词:** 发酵 脂肪酶 基因工程菌 高密度发酵 放大

## Recent Progress on the Production of Lipase by Microbial Fermentation

Wang Xiaofeng Wang Jun Yang Jiangke Yan Yunjun

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074)

**Abstract:** Lipase is one of the most important enzymes for industry application. They are extensively applied in food, fine chemistry, medicine and energy industry. Fermentation by microorganism is the major approach in production of lipase. In this paper, research progress in these areas, including microorganisms secreting lipase, screening high-yield was summarized microbial strains, optimizing and regulating fermentation, high cell density fermentation and scale-up production of lipases. The prospect for development of lipase production was also discussed here.

**Key words:** Fermentation Lipase Genetic engineering microorganism High cell density fermentation Scale-up

脂肪酶( EC 3.1.1.3), 又称三酰甘油酰基水解酶。在传统酶学中, 脂肪酶是一类水解长链脂肪酸甘油酯生成游离脂肪酸和甘油的界面酶。作为重要的工业用酶, 广泛应用于食品、制革、饲料、洗涤、油脂化工等传统工业领域<sup>[1]</sup>。1984 年, Zaks 和 Klibanov 在有机溶剂体系中, 以脂肪酶粉为催化剂, 成功地催化合成了一系列有机化合物<sup>[2]</sup>。该研究揭开了非水相酶学的研究序幕, 并迅速成为应用酶学研究中最活跃、发展最为迅速的领域。脂肪酶是非水相酶学中最重要的一类酶。显著不同于在水相体系中的水解反应特性, 脂肪酶在非水相体系中具有好的酯化、转酯、醇解和胺解等特性。该特性使脂肪酶可被广泛地应用于生物能源(生物柴油)、药物合成等应用前景广阔的领域<sup>[3, 4]</sup>。

脂肪酶广泛存在动物、植物和微生物中。动物

体内含脂肪酶较多的是高等动物的胰脏和脂肪组织等, 而植物中含脂肪酶较多的是油料作物的种子。而微生物脂肪酶种类最多, 广泛存在于细菌、酵母和霉菌中, 最易获得和大规模生产, 且具有比动植物脂肪酶更广的 pH、温度适应性, 因此是工业用脂肪酶的重要来源。自 20 世纪初首次发现以来, 便得到广泛研究和应用。近 20 年来, 微生物脂肪酶发酵研究主要集中在高产菌株的筛选、常规诱变育种、基因工程菌的构建、发酵工艺条件优化、发酵工艺放大和酶的分离纯化等方面, 其中脂肪酶工程化技术的研究是其能否实现工业化生产的关键。

### 1 微生物脂肪酶种类

目前, 已知大约有 2% 的微生物产脂肪酶<sup>[3]</sup>, 至少包括 65 个属的微生物, 其中细菌 28 个属、放线

收稿日期: 2008-02-27

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2006AA020203, 2007AA05Z417) 和武汉市攻关项目(200720422138)

作者简介: 汪小锋(1983-), 男, 在读硕士, 研究方向: 发酵工程与酶工程, E-mail: wxf7907@163.com

通讯作者: 闫云君(1969-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 能源生物技术与生态学, E-mail: yanyunjun@tom.com

菌 4 个属、酵母菌 10 个属、其它真菌 23 个属, 且不同微生物来源的脂肪酶其组成成分、理化特性各不相同。脂肪酶产生菌中得到深入研究的主要有根霉、曲霉、青霉、毛霉、假单胞菌等具有工业应用价值的菌种, 以及与医学相关的金黄色葡萄球菌、钩端螺旋体、粉刺状杆菌等。

1.1 细菌脂肪酶

细菌脂肪酶在大规模商业化生产中扮演着重要角色。细菌脂肪酶大多数是胞外酶易于液体深层发酵, 生产比较容易<sup>[5]</sup>。细菌脂肪酶大多数是碱性脂肪酶, 且在 pH4~11、温度 30 ~60 间具有良好的稳定性。大多数细菌脂肪酶是糖蛋白, 但也有些细菌胞外脂肪酶是脂蛋白<sup>[6]</sup>。细菌脂肪酶的发酵生产主要受温度、pH、碳氮源、脂类物质、无机盐、搅拌和溶氧浓度等因子的影响。细菌脂肪酶的生产培养基一般是由有机氮源和油脂性的碳源组成, 如油、脂肪酸、甘油和吐温等。通常, 脂肪酶生产的温度范围为 20 ~45 , 诱导时间从几小时到 3~4d 不等, 但大多数集中在 72h~92h 间。目前一些数细菌的

野生菌或重组菌株得到了商业开发, 其中最重要的是无色杆菌 (*Achromobacter*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*)、节细菌属 (*Arthrobacter*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、伯克霍尔德菌 (*Burkholderia*)、色杆菌 (*Chromobacterium*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 尤其是假单胞菌属的细菌脂肪酶应用最为广泛(表 1)。

1.2 真菌脂肪酶

直到 1950 年才开始进行真菌脂肪酶的研究。由于真菌脂肪酶具有温度和 pH 稳定性、底物特异性以及在有机溶剂中具有高活性, 且提取成本比较低等优点, 因而发展迅速<sup>[6]</sup>。目前商业化的真菌脂肪酶主要有: 黑曲霉 (*Aspergillus niger*), 米曲霉 (*Thermomyces Lanuginosus*), 高温毛壳霉 (*Humicola lanuginosa*), 米赫毛霉 (*Mucor miehei*), 少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*), 德氏根霉 (*Rhizopus delemar*), 日本根霉 (*Rhizopus japonicus*), 雪白根霉 (*Rhizopus niveus*), 米根霉 (*Rhizopus oryzae*), 皱褶假丝酵母 (*Candida rugosa*), 南极假丝酵母 (*Candida antarctica*), 柱状假丝酵母 (*Candida cylindracea*) 等(表 1)。

表 1 部分商品化微生物脂肪酶

类型	来源	应用	生产公司
细 菌	<i>Ch.viscosum</i>	有机合成	Asahi, Biocatalysts
	<i>P.mendocina</i>	去污剂添加剂	Genencor International
	<i>P. alcaligenes</i>	去污剂添加剂	Gist-Brocades, Genencor International
	<i>P. cepacia</i>	有机合成	Amano, Altus Biologics, Boehringer annheim, Fluka
	<i>Bacillus pumilus</i>	去污剂添加剂	Solvay
	<i>P. fluorescens</i>	有机合成, 化工, 生物转化	Amano, Biocatalysts
	<i>C. viscosum</i>	有机合成, 化工, 生物转化	Asahi Chemical Biocatalysts, Biocatalysts
	<i>Alcaligenes sp.</i>	有机合成	Meito Sankyo Co.
真 菌	<i>R.miehei</i>	食品工业	Novo-nordisk, Biocatalysts, Amano
	<i>T.lanuginosus</i>	去污剂添加剂	Boehringer Mannheim, Novo-nordisk
	<i>C.antarctica</i>	有机合成	Boehringer Mannheim, Novo-nordisk
	<i>C.rugosa</i>	有机合成	Amano, Genzyme, Sigma,Biocatalysts
			Boehringer Mannheim, Meito Sangyo
	<i>Geotrichum candidum</i>	生物转化	Boehringer Mannheim, Novo-nordisk
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	有机合成	Amano
	<i>Rhizopus sp.</i>	有机合成, 生物转化	Amano, Serva, Sangyo, Sigma

2 脂肪酶高产菌株的选育

脂肪酶的筛选方法着眼于快速、简捷、准确、选择性强及易于自动化上。筛选脂肪酶高产菌通常采用含甘油三酯琼脂平板法, 并通过在培养基中添加指示剂如罗丹明 B、溴甲酚紫、维多亚蓝等作为筛

选标记。

提高脂肪酶产量的途径主要有菌种改良和发酵工艺优化 2 种途径。菌种改良的主要途径主要有菌种驯化、诱变育种和基因工程改造等。通过贫瘠培养驯化和定向诱导可使产酶菌株对简单底物的

利用能力加强,一定程度提高菌株的产酶活力。它也是退化菌种复壮的常用手段之一。

## 2.1 诱变菌种

诱变育种是微生物改良的常用方法。目前,以紫外线、亚硝酸、亚硝基胍、硫酸二乙酯、快中子等理化因子作为诱变剂,利用低温、溴化乙锭、胆盐、制霉菌素、克霉唑、琥珀酸钠、柠檬酸钠、丁酸、己酸、三丁酸甘油酯等作为正突变筛选剂的诱变策略,已成功应用于扩展青霉、黑曲霉、假单胞菌、酵母等多种产脂肪酶菌株的诱变筛选。采用上述诱变和筛选方法,一般可以将脂肪酶产量提高 1~10 倍,最高可达 40 倍<sup>[7]</sup>。

## 2.2 构建脂肪酶基因工程菌

蛋白质工程及分子技术在菌种改良中具有重要的作用。利用蛋白质工程改造菌株主要有随机突变与定点突变两种方式。随机突变即通过不同突变产生大量突变菌株,需要通过有效的筛选方法才能得到产酶量大幅提高的突变株。定点突变筛选具有某一相关特性的变异株,再由其中筛选出高产菌株,从而可大大提高筛选品质和效率,且一定程度上克服了诱变育种的盲目性。目前,利用分子生物学手段筛选脂肪酶高产菌株已越来越受到研究人员的重视。如 *Candida cylindracea* 具有 5 个不同的脂肪酶基因,编码同源性在 80% 以上的 5 个脂肪酶<sup>[8]</sup>,具有脂肪酶基因的多态性。利用这一多态性通过现代基因工程技术,不仅能够改造原有的产酶菌株,而且能直接利用生物反应器高通量表达生产脂肪酶。

通常情况下利用常规育种方法难以满足工业化生产的需要,通过基因工程手段克隆脂肪酶基因,并研究其基因表达调控,可以大幅提高脂肪酶的产量。大肠杆菌表达系统、酵母表达系统和曲霉表达系统是应用最为广泛的 3 种异源表达系统,许多脂肪酶基因均在这些表达系统中实现了大量表达<sup>[9]</sup>。采用分子伴侣基因与脂肪酶基因共表达、分泌蛋白基因与脂肪酶基因共表达和构建蛋白酶缺陷突变菌株也能不同程度上提高脂肪酶的产量和稳定性。此外,通过改造脂肪酶基因及分泌蛋白基因以提高脂肪酶产量、活性和稳定性也有许多成功的报道<sup>[7]</sup>。

目前,越来越多的细菌和真菌的重组菌实现了商业化生产。1988 年丹麦 Novo 公司成功将柔毛腐质霉 (*Humicola Lanuginosus*) 的碱性脂肪酶基因克隆导入适合发酵生产的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 工程菌株中,脂肪酶产量提高了近 1 000 倍<sup>[10]</sup>,实现了年产几百吨的工业化生产。这是第一个运用基因工程技术生产脂肪酶从实验室走向市场的成功范例。Motoyasu 等报道脱氮产碱杆菌 TK7 的脂肪酶基因经克隆后转移到大肠杆菌中,并得到比原菌体高 20 倍左右的表达<sup>[4]</sup>; Gerritse 等采用同源表达方式将 *P. alcaligenes* M-1 菌株的脂肪酶产量提高了 23 倍<sup>[11]</sup>; Shibatani 等分别采用同源表达和分泌蛋白基因与脂肪酶基因共表达策略将 *S. marcescens* 菌株产生的胞外脂肪酶提高了 13 倍和 140 倍<sup>[12]</sup>; Pfeiffer 等将 *Candida antarctica* 脂肪酶基因 CalA 表达在毕赤酵母中,粗酶比酶活最大达到 653U/mg,比商业化的 CalA 基因表达的脂肪酶 Novozym 735 提高了 106 倍<sup>[13]</sup>; Ma 等采用强启动子大量表达 *B. subtilis* 脂肪酶,酶产量较原始菌株提高了 100 倍<sup>[14]</sup>。

微生物脂肪酶的高效生产不仅需要脂肪酶基因的高效表达,还需要酶蛋白质的有效折叠和分泌。基因工程技术和新生产技术的联合使用改善了工业用酶的性能、降低了生产成本、提高了产品质量、大大减少了对环境的影响。

## 3 脂肪酶的发酵生产

尽管产脂肪酶的微生物分布广泛,但寻找适于工业生产的脂肪酶产生菌却比较困难。Fagery 认为优良产酶菌株的标准应是发酵周期短、营养基质低廉、菌株易分离、胞外酶、非致病菌、不产生毒素、遗传性状稳定及对噬菌体不敏感等。脂肪酶产量不仅可以通过菌种改良(包括传统育种和基因工程菌的构建),而且还可以通过对发酵条件优化来提高。同样的菌种,不同的发酵条件可能会对产酶量产生巨大的差异。因此,发酵条件的优化和发酵调控策略对脂肪酶的工业化生产具有重要的意义。

### 3.1 微生物脂肪酶的发酵培养基

适当而丰富的营养物是菌体生长和酶大量产生的重要前提。由于脂肪酶产生菌和酶特性的不同,培养基配比和培养条件也各不相同。培养基一般由碳源、氮源诱导物及常见的无机盐等组成。



常见碳源包括油脂、可溶性淀粉、玉米粉、葡萄糖、果糖、糊精、糖蜜、麦麸和小麦粉等；速效碳源如葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等有利于细菌脂肪酶的形成<sup>[15]</sup>，而缓效碳源如玉米粉和小麦粉等则有利于真菌脂肪酶的形成<sup>[16]</sup>。也有报道指出，当培养基中含有单糖、双糖和甘油，能抑制脂肪酶产生<sup>[17, 18]</sup>。

氮源分为无机氮源（硫酸铵、硝酸铵、尿素等）、有机氮源（如大豆粉、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白等）和复合氮源。一般认为复合氮源对微生物生长及产酶效果较好<sup>[16]</sup>。有机氮源一般比无机氮源要好，如蛋白胨和酵母膏在细菌脂肪酶的生产中应用十分广泛。但有些文献报道  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  等无机氮源也在部分微生物的脂肪酶生产中有较好的效果<sup>[15, 19]</sup>。

微量元素和某些添加物对发酵产酶也会产生重要影响。Rashid 的研究表明添加 EDTA 于反应体系中能完全抑制适冷假单胞菌 KB700A 所产的低温脂肪酶的活力，而添加  $\text{Ca}^{2+}$  能显著提高酶活<sup>[20]</sup>。此外， $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  能促进脂肪酶的分泌<sup>[21, 22]</sup>。

大多数微生物只有诱导物存在时才能产生脂肪酶。诱导物可以是甘油三酯、长链脂肪酸、脂肪酸酯及其表面活性剂。许多研究表明培养基中添加表面活性剂如 Tween 80、Triton X-100、SDS、PEG 和阿拉伯胶等可以不同程度地提高脂肪酶的产量<sup>[23]</sup>。表面活性剂促进产酶主要是由于增加细胞的通透性，使脂肪酶易于分泌到胞外<sup>[24]</sup>。Corzo 等报道 Tween 80 的浓度在 0.5g/L 到 2g/L 时能增加胞外脂肪酶活性而不改变生物量浓度，油酸强烈抑制脂肪酶活性<sup>[25]</sup>。添加 0.5% 的 Triton X-100 能使 *Aspergillus niger* 突变菌株产酶量提高 1.6 倍<sup>[26]</sup>。阴离子表面活性剂 SDS (10mmol/L) 能使脂肪酶的催化活性提高 25.5%<sup>[19]</sup>。

### 3.2 培养基及发酵条件优化

优良的生物产品从实验室水平到工业化生产首先要解决的问题是生物过程的优化。工业发酵过程中，设计一个发酵培养基是至关重要的。培养基的组成显著影响产品浓度、产量和效率；在商业化生产中，培养基成本能显著影响总生产成本。优化培养基涉及大量的实验研究，是一个耗时、耗力、耗费的过程<sup>[5]</sup>。影响发酵过程的因素有很多，主要包括培养基组成、接种量、种龄、培养温度、转速、装液

量、发酵周期、溶氧、pH 值和通气条件等，这些因素往往又不是独立影响发酵过程的，常常是交互作用。除传统的单因子法、正交设计法在生物过程优化中得到广泛应用外，响应面法、均匀设计法、人工神经网络、模糊逻辑控制、专家系统、遗传算法和化学计量分析等一批更有效的新方法也在发酵培养基的优化及过程控制中逐步得到推广应用，并日益显示出优越性<sup>[27]</sup>。其中响应面法应用最广，一般可以将脂肪酶产量提高 1~10 倍，最高可达 12 倍<sup>[28]</sup>。

### 3.3 脂肪酶发酵的培养方式与发酵调控

脂肪酶的生产有传统的固态培养<sup>[29]</sup>、液态发酵<sup>[18]</sup>和细胞固定化方法<sup>[30]</sup>等。目前生产上常采用液体深层培养法生产脂肪酶，作为节约生产成本的连续发酵、固定化细胞发酵和固态发酵技术在脂肪酶生产中也有较多成功实例<sup>[7]</sup>。

液体深层培养易于控制，不易染杂菌，生产效率高，但分离纯化成本高，且会产生大量的污水<sup>[29]</sup>。液体深层培养通常采用分批 (batch)、补料分批 (fed-batch) 和连续 (continuance) 发酵。补料分批发酵法是介于分批发酵和连续发酵之间的过渡类型，兼有 2 种培养方式的优点，在脂肪酶的生产中应用最为广泛<sup>[31]</sup>。许多文献报道补料分批发酵法所得产物的量要比分批发酵高<sup>[32]</sup>。Patrick 以橄榄油和蛋白胨作为 *Yarrowia lipolytica* 培养的碳源和氮源，采用补料分批发酵所得酶活比分批发酵提高了 6 倍<sup>[18]</sup>。补料优化策略是液体发酵过程优化的关键，通常以基质的补料速率为主控制量，溶氧、pH、细胞浓度 (x)、底物浓度 (s)、比生长速率 ( $\mu$ )、摄氧率 (OUR)、氧传递速率 (OTR)、 $\text{CO}_2$  生成速率 (CER) 和呼吸商 (RQ) 等变量为辅助控制量<sup>[33]</sup>，求取优化控制使得发酵终止时产物产量最高。

常用的流加模式分为非反馈补料和反馈补料。非反馈补料分为恒速补料、变速补料、指数补料 3 种；反馈补料又分为 pH-stat 法、恒溶解氧法、菌体浓度反馈法、CER 法和 DO-stat 法等<sup>[34]</sup>。具体采用那种补料方式要根据菌体的代谢特性而定。恒速补料最为常用<sup>[32]</sup>；指数补料策略因可以达到高密度培养的目的，在发酵生产中受到广泛关注。在 7.5L 发酵罐中，*C. cylindracea* 脂肪酶的发酵采用恒速补料时细胞浓度和酶活分别比摇瓶中提高 10 倍和 2 倍；

指数补料的细胞浓度和酶活又分别比恒速补料提高了 1.7 倍和 4 倍<sup>[31]</sup>。各种反馈补料的效果因菌种的不同而呈现较大差异。采用控制溶氧的补料策略 *P. aeruginosa* 脂肪酶酶活比恒速底物补料提高 6.6 倍<sup>[36]</sup>; Gordillo 等采用控制比生长速率的分批补料策略, *Candida rugosa* 脂肪酶生产力比分批发酵提高了 10 倍; DO-stat 和 pH-stat 等不同补料策略的本质区别是补料速率不同, DO-stat 补料与恒速补料接近, pH-stat 补料与指数补料接近<sup>[36]</sup>。通常要对比研究不同的补料方式才能确定最优的补料策略。Li 等报道以溶氧作为控制因素进行反复分批补料发酵, 脂肪酶最高生产力是以 pH 为控制因素分批补料时的 3.3 倍<sup>[37]</sup>。

固体培养设备比较简单、成本低、对环境危害小、易于推广, 但放大比较困难、培养参数控制较复杂、容易污染杂菌。有些霉菌可通过固态发酵及液体深层发酵两种方式进行脂肪酶发酵生产, 具体采用那种培养方式要根据菌种的特性决定。Castilho 研究了 *Penicillium restrictum* 脂肪酶分别采用固体发酵和液体发酵的成本, 当生产规模为 100M<sup>3</sup>/年时固体发酵比液体发酵相比具有更大的经济效益<sup>[38]</sup>, 固体发酵过程最大的优势是培养基的原料非常便宜。Bhushan 等以米糠和麦麸为底料培养酵母生产碱性脂肪酶<sup>[39]</sup>; Ikram 等在 30 °C 下用麸皮和磷酸盐培养根霉菌 72h, 然后用液体抽提液抽提得到脂肪酶<sup>[40]</sup>; Rodriguez 等<sup>[41]</sup>以甘蔗渣为固体支持物, 橄榄油、尿素、乳糖和无机盐为培养基, 对 *Rhizopus homothallicus* 固体培养 12h, 脂肪酶酶活最高达 826U/g DM; Azeredo 等<sup>[42]</sup>以葡萄糖作为碳源采用不同的方式发酵生产 *Penicillium restrictum* 脂肪酶时, 只有固体发酵检测到酶活, 可能是由于固态发酵代谢抑制作用最小。

细胞固定化发酵主要应用于霉菌和酵母的发酵生产中, 其主要优点有: 提高微生物细胞的稳定性; 缩短发酵时间; 易于实现高密度培养和连续发酵操作; 连续发酵时, 避免高稀释率时菌体流失; 过程控制和下游操作比传统的分批培养简单; 废载体可作为固定化细胞用于催化反应<sup>[43]</sup>。有关脂肪酶细胞固定化发酵方面的文献报道较少。1992 年, Ferrer 等在流化床反应器中将 *Candida*

*rugosa* 细胞固定在海藻酸钙和聚亚安酯泡沫组成的固体支持物上, 成功实现了胞外脂肪酶的连续发酵生产; Elibol 等 (2000) 将 *Rhizopus arrhizus* 细胞固定在聚亚安酯泡沫载体上, 其持续产脂肪酶达 120h<sup>[44]</sup>; 尹春华等 (2002) 以珍珠岩和聚氨酯泡沫为固定化载体固定少根根霉细胞发酵生产脂肪酶, 酶活性比无载体直接发酵高 6~8 倍, 产酶后固定化根霉细胞的废载体有较高酶活性可直接作固定化细胞用于催化化学反应<sup>[30]</sup>。Yang 等 (2005) 以聚氨酯为少根根霉固定化载体, 对固定化后的细胞连续重复批次发酵进行了研究, 在摇瓶和 5L 发酵罐中分别重复发酵 9 批和 6 批, 脂肪酶的生产力比分批发酵提高了 5.6 倍<sup>[45]</sup>。同时, 随着对固定化载体、质量传递效率、物理化学条件和动力学和工程模型等影响固定化细胞生产技术的深入研究, 固定化细胞发酵生产将在未来脂肪酶的发酵生产中发挥重要作用。

此外, 不同的生物反应器对脂肪酶发酵也具有显著影响。Burkert 等<sup>[46]</sup>发现白地霉 (*Geotrichum candidum*) 脂肪酶在气升式发酵罐中的生产力比搅拌式大约高出 60%, 产等量酶需要的能量比搅拌式低。李丹等<sup>[47]</sup>将转盘式反应器成功应用到固定化根霉细胞重复批次发酵生产脂肪酶, 产酶量比分批发酵提高了 3.5 倍。因此, 要实现脂肪酶生产的高效率、低成本, 不仅需要优良的菌种和廉价的培养基, 运用合适的培养方式, 而且必须结合反应器的合理设计、配置、操作和控制, 才能真正实现。

### 3.4 高密度发酵

高密度发酵是获得高产工业酶的有效途径。它是在传统发酵基础上建立起来的通过提高菌体的发酵密度而最终提高产物比生产率的发酵技术。具有减少生产设备投资、强化下游分离提取、综合提高比生产率等诸多优点。高密度培养最早是在酵母中实现的, 主要生产单细胞蛋白、乙醇和酵母细胞, 后来才应用到其它微生物之中。高密度是一个相对概念, 只有 *Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Sulfolobus shibatae*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris* 等部分微生物的生物量干重浓度可以达到 100g/L 以上, 另外一些微生物生长的高细胞浓度在 20g/L~100g/L 的范围内, 大多数的微生物尽管采用各种发酵策略细胞干重只能达到几克每升<sup>[48]</sup>。高密度发酵

主要应用在大肠杆菌和毕赤酵母重组菌的发酵生产中,用来生产药用蛋白和多肽等,在脂肪酶的发酵生产中的应用很少。控制营养物质流加的分批补料是高密度发酵通常采用的方法。Kim等通过控制比生长速率,指数补料最终实现了 *Candida cylindracea* 的高密度培养,细胞浓度最高达到 90g/L。比生长速率对重组蛋白在毕赤酵母中表达具有重要的影响<sup>[49]</sup>, Resina 等以比生长速率为控制因素,山梨糖和甲胺作为补料的碳氮源,利用指数补料使米根霉重组菌细胞浓度达到 50g/L。大肠杆菌和毕赤酵母能达到较高的细胞密度(100g/L 以上),比较容易实现高密度培养,在工程菌的发酵生产中发挥着重要作用。Pfeffer 等在 5L 发酵罐中分别采用分批补料和半连续发酵生产 CalA 基因表达的脂肪酶<sup>[13]</sup>,毕赤酵母细胞最大干重分别达到 110g/L 和 160g/L。

高密度培养也有一些缺点,如底物抑制、溶氧限制、产生大量泡沫、产物的不稳定和降解、CO<sub>2</sub> 的积累、代谢副产物抑制和排热限制等。目前,成功实现高密度发酵培养的微生物主要还是重组的大肠杆菌和毕赤酵母,且高密度培养细胞群体的调控机制还不清楚。随着基因工程技术在脂肪酶菌种改良方面日益广泛应用,以及发酵控制技术、检测技术和反应器工程技术的快速发展,高密度发酵技术将会在脂肪酶的发酵生产中发挥重要作用。

### 3.5 发酵工艺放大

发酵罐和发酵工艺的放大是发酵工程中的一个重要课题。国内外均有很多文献报道,在此不再赘述。但在脂肪酶的发酵放大工艺方面的报道不多<sup>[11,50]</sup>。许多研究者通常以摇瓶中最优培养基作为小型发酵罐中的初始培养基进行初步放大,通过优化小型发酵的发酵工艺确定最佳工艺参数,以小型罐中的培养基和最佳工艺参数为基础逐级放大到工业规模。为了降低发酵成本,大型罐中培养基需要更换成廉价易得的工业原料。

谭天伟等<sup>[51]</sup>成功实现了 *Candida sp.* 脂肪酶从摇瓶到 1 500L 发酵罐的逐级发酵放大,且从 30L~1 500L 的放大过程中酶活力保持稳定;李江华等<sup>[52]</sup>在圆弧青霉 PG37 碱性脂肪酶的发酵工艺研究中以摇瓶中最优发酵培养基和培养条件为基础放大到 25L 发酵罐,酶活力与摇瓶中相当,但发酵时间

缩短了 24h,以 25L 发酵罐的发酵为基础成功实现了 3M<sup>3</sup> 发酵罐中试放大,且酶活性保持不变;Gerrits 等<sup>[11]</sup>研究了 *P. alcaligenes* 同源重组菌株脂肪酶从实验室水平的 10L 到工业应用水平 4M<sup>3</sup>、100M<sup>3</sup> 的发酵放大,但在放大过程中酶活逐渐下降,100M<sup>3</sup> 发酵罐酶活只有 10L 发酵罐的 65%;他们发现 CO<sub>2</sub> 溶解水平增加是放大过程酶活降低的主要原因;从小试规模放大到 100M<sup>3</sup> 过程中,100L 和 4M<sup>3</sup> 发酵罐作为种子罐,培养基,温度, pH 和补料速率不随发酵放大而改变,只有通气量随发酵规模的变化而变化,10L 是 1vvm;100L 是 2vvm,4M<sup>3</sup> 是 0.5vvm,100M<sup>3</sup> 是 0.4vvm。

发酵规模放大过程中最关键的是氧的供应和细胞形态的变化,但目前尚未得到一个十分有效的放大关联式,发酵罐的放大工艺仍处于经验或半经验状态,因此深入研究发酵罐的放大对脂肪酶大规模工业化生产具有重要意义。

### 4 结束语

酶的开发和应用具有巨大市场前景。2004 年全球工业用酶产值达 20 亿美元,年平均增长率 4%~5%,预计到 2009 年将达到 24 亿美元。脂肪酶不仅在食品加工、洗涤剂、制药、精细化工、有机合成和脱脂等传统工业应用日益广泛,而且还在生物传感器、诊断工具酶、生物柴油合成等新领域的应用也受到广泛关注<sup>[3]</sup>。市场对脂肪酶的需求不断增长,使得脂肪酶的研究方向由发掘新的脂肪酶逐渐转向提高现有脂肪酶性能以满足市场的需求。由于目前商业化的脂肪酶成本相对较高,使得脂肪酶在更大范围的应用受到一定限制,因此通过发酵工程技术提高脂肪酶的生产力是一个非常迫切的工作。另外,探索新型固定化技术以提高脂肪酶利用率,采用全细胞催化和表面展示技术降低发酵成本等方面的研究越来越受到研究人员的重视。传统的发酵培养技术及细胞固定化方法、高效基因工程菌、高密度发酵等新技术手段在脂肪酶发酵生产方面的成功运用,降低了脂肪酶的生产成本,加速了脂肪酶产品工业化进程,拓宽了脂肪酶的应用范围。随着发酵控制和检测技术的发展,脂肪酶的产量还将进一步提高,脂肪酶产品的成本也将逐渐降低,其应用范围也将越来越广泛。



目前,我国脂肪酶的研发及产业化水平与国外存在较大差距,不仅需要优良的菌种资源,同时也需要研制设计高效能的生物反应器以及先进发酵及控制技术,以获得高产满足市场需要。

#### 参考文献

- 1 Jaeger KE, Eggert T. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13(4): 390~397.
- 2 Zaks A, Klibanov AM. *J Biol Chem*, 1988, 263(7): 3194~3201.
- 3 Hasan F, Shah AA, Hameed A. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(2): 235~251.
- 4 肖春玲. *微生物学杂志*, 1997, 17(4): 56~59.
- 5 Gupta R, Gupta N, Rath P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(6): 763~781.
- 6 Saxena RK, Ghosh PK, Gupta R, et al. *Curr Sci*, 1999, 77(1): 101~115.
- 7 舒正玉, 王爱玲, 杨江科, 等. *工业微生物*, 2007, 27(3): 52~57.
- 8 Lotti M, Grandori R, Fusetti F, et al. *Gene*, 1993, 124(1): 45~55.
- 9 Schmidt-dannert, Claudia. *Bioorg Med Chem*, 1999, 7(10): 2123~2130.
- 10 Adrio JL, Demain AL. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 187~214.
- 11 Gerritse G, Hommes RW, Quax WJ. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(7): 2644~2651.
- 12 Shibatani T, Omori K, Akatsuka H, et al. *J Mol Catal B: Enzym*, 2000, 10(1~3): 141~149.
- 13 Pfeffer J, Richter S, Nieveller J, et al. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 931~938.
- 14 Ma J, Zhang Z, Wang B, et al. *Protein Expr Purif*, 2006, 45(1): 22~29.
- 15 Lanser AC, Manthey LK, Hou CT. *Curr Microbiol*, 2002, 44(5): 336~340.
- 16 Tan T, Zhang M, Xu J, et al. *Proc Biochem*, 2004, 39(11): 1495~1502.
- 17 宋欣, 曲音波. *工业微生物*, 1999, 29(4): 22~26.
- 18 Fickers P, Fudalej F, Nicaud JM, et al. *J Biotechnol*, 2005, 115(4): 379~386.
- 19 邵铁娟, 孙谧, 郑家声, 等. *微生物学报*, 2004, 44(6): 789~793.
- 20 Rashid N, Shimada Y, Ezaki S, et al. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(9): 4064~4069.
- 21 Gulati R, Saxena RK, Gupta R, et al. *Proc Biochem*, 1999, 35(5): 459~464.
- 22 Rath P, Saxena RK, Gupta R. *Proc Biochem*, 2001, 37(2): 187~192.
- 23 Bapiraju KVVSN, Sujatha P, Ellaiyah P, et al. *J Basic Microbiol*, 2005, 45(4): 257~273.
- 24 Costas M, Deive FJ, Longo MA. *Proc Biochem*, 2004, 39(12): 2109~2114.
- 25 Corzo G, Revah S. *Bioresour Technol*, 1999, 70(2): 173~180.
- 26 Mahalik ND, Bastawde KB, Puntambekar US, et al. *Proc Biochem*, 2004, 39(12): 2031~2034.
- 27 Kennedy M, Krouse D. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1999, 23(6): 456~475.
- 28 Gupta N, Sahai V, Gupta R. *Proc Biochem*, 2007, 42(4): 518~526.
- 29 Nagy V, Toke ER, Keong LC, et al. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, 39(1~4): 141~148.
- 30 尹春华, 傅四周, 等. *过程工程学报*, 2002, 2(6): 534~538.
- 31 Kim B, Hou C. *Bioproc Biosyst Eng*, 2006, 29(1): 59~64.
- 32 Gordillo MA, Montesinos JL, Casas C, et al. *Chem Phys Lipids*, 1998, 93(1~2): 131~142.
- 33 Lee J, Lee SY, Park S, et al. *Biotechnol Adv*, 1999, 17(1): 29~48.
- 34 涂桂云, 李敏. *工业微生物*, 2004, 34(3): 49~52.
- 35 Michel C, Colleen M, Lorraine K, et al. *J Ferment Bioeng*, 1993, 76(6): 487~492.
- 36 Li CY, Cheng CY, Chen TL. *Biochem Eng J*, 2004, 19(1): 25~31.
- 37 Li CY, Chen SJ, Cheng CY, et al. *Biochem Eng J*, 2005, 25(3): 195~199.
- 38 Castilho LR, Polato CM, Baruaque EA, et al. *Biochem Eng J*, 2000, 4(3): 239~247.
- 39 Bhushan B, Dosanjh NS, Kumar K, et al. *Biotechnol Lett*, 1994, 16(8): 841~842.
- 40 Ul-haq I, Idrees S, Rajoka M. *Proc Biochem*, 2002, 37(6): 637~641.
- 41 Rodriguez JA, Mateos JC, Nungaray J, et al. *Proc Biochem*, 2006, 41(11): 2264~2269.
- 42 De AL, Gomes P, Sant AG, et al. *Curr Microbiol*, 2007, 54(5): 361~365.
- 43 Ferrer P, Sol C. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37(6): 737~741.
- 44 Eliab M, Ozer D. *Proc Biochem*, 2000, 36(3): 219~223.
- 45 Yang X, Wang B, Cui F, et al. *Proc Biochem*, 2005, 40(6): 2095~2103.
- 46 Jana FM. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, 80(1): 61~67.
- 47 李丹, 张大皓, 谭天伟. *化工学报*, 2007, 58(9): 2347~2351.
- 48 Riesenber D, Guthke R. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 51(4): 422~430.
- 49 Resina D, Cos O, Ferrer P, et al. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 91(6): 760~767.
- 50 Fickers P, Ongena M, Destain J, et al. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(6): 756~759.
- 51 Tan T, Zhang M, Wang B, et al. *Proc Biochem*, 2003, 39(4): 459~465.
- 52 李江华, 邬敏辰. *无锡轻工大学学报(食品与生物技术)*, 2000, 19(3): 213~215.