

文章编号 :1009-038X(2000)01-0023-03

甘露糖赤藓糖醇脂的分批发酵动力学*

华兆哲¹, 陈 坚¹, 朱文昌¹, 伦世仪¹, 谢国银², 缪 晔²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. 无锡世纪生物工程有限公司, 江苏无锡 214092)

摘 要:在台式发酵罐上研究了 *Candida antarctica* 以豆油为碳源生产生物表面活性剂甘露糖赤藓糖醇脂(MEL)的分批发酵动力学,考察了不同的植物油作为碳源对生产 MEL 的影响,发现精制豆油为最佳碳源.在分批发酵实验中发现,pH 值对 *C. antarctica* 的 MEL 生产影响不大,豆油质量浓度过高对菌体生长有一定的抑制作用.

关键词:南极假丝酵母;甘露糖赤藓糖醇脂;分批发酵动力学

中图分类号: Q546 **文献标识码:** A

Kinetics of Batch Fermentation Mannosylerythritol Lipid(MEL)

HUA Zhao-zhe¹, CHEN Jian¹, ZHU Wen-chang¹, LUN Shi-yi¹, XIE Guo-yin², MIAO Ye²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036; 2. Wuxi Century Bioengineering Co. Ltd., Wuxi 214092)

Abstract: The kinetics of batch fermentation with mannosylerythritol lipid(MEL) produced from soybean oil by *Candida antarctica* was studied in a 2 L fermentator. The experiment was conducted to find the effect of different triacylglycerols acting as carbon source on MEL production and thus soybean oil was selected as the optimum substrate. It showed that the influence of pH was not significant and high concentration of soybean oil somewhat inhibited the cells growth in batch fermentation.

Key words: *Candida antarctica*; mannosylerythritol lipid(MEL); kinetics of batch fermentation

微生物糖脂是生物表面活性剂中数量最大,品种最多的一类,而甘露糖赤藓糖醇脂(Mannosylerythritol,简称 MEL)是糖脂中研究得较少的一种.已有的研究表明,MEL 是一种非离子型生物表面活性剂^[1~3],其非极性的疏水基是脂肪酰基链,极性的亲水基是糖基. MEL 主要是霉菌、酵母等在各种碳源,特别是疏水性基质(植物油或烃类)中培养时产

生的,由于其潜在的应用价值及对环境的友善性,国外已在 MEL 的微生物生产方面进行了一些研究^[4,5],国内目前尚未见报道.

作者从几株 MEL 生产菌中选择了一株生产能力良好的菌株(*Candida antarctica*) IFO 10182,考察了其以不同植物油为碳源时的 MEL 生产能力,并在小型台式发酵罐上进行了不同条件的分批发

* 收稿日期:1999-04-15 修订日期:1999-11-25.

基金项目:江苏省青年科技基金项目(BQ94019).

作者简介:华兆哲(1969 年 6 月生),男,江苏无锡人,发酵工程博士研究生,讲师.

酵实验,建立了 *Candida antarctica* 的分批发酵动力学模型.

1 材料与方法

1.1 菌种

实验菌种 *Candida antarctica* IFO 10182,购自日本菌种保藏中心.

1.2 生物表面活性剂的生产与定量方法

1.2.1 生物表面活性剂的生产 先将 *C. antarctica* 在种子培养基中以 30 ℃、220 r/min 培养 48 h,种子培养基组成:葡萄糖 60 g/L,NaNO₃ 2.0 g/L,KH₂PO₄ 0.5 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,酵母浸膏 1.0 g/L,pH 6.0. 然后接入 2 L 的发酵罐中进行分批发酵培养,装液量为 1.8 L,接种量为 8%,发酵温度 30 ℃,搅拌转速 700 r/min,通风量为 1.0 L/(L·min),发酵培养基组成为:豆油 72 g/L,NaNO₃2.0 g/L,KH₂PO₄ 0.2 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L,酵母浸膏 1.0 g/L,pH 6.0.

1.2.2 生物表面活性剂的定量方法 生物表面活性剂 MEL 的定量分析采用蒽酮法^[5].

将发酵液以乙酸乙酯萃取,取溶剂层用 N₂ 流去除干扰蒽酮显色的溶剂,加入蒽酮显色剂,在沸水浴中加热 10 min,冷却后在 620 nm 下测定 OD 值.

2 结果与讨论

2.1 *C. antarctica* 以不同植物油为碳源生产生物表面活性剂 MEL 的比较

作者以植物油作为 *C. antarctica* 生产 MEL 的主要碳源,对以下几种植物油进行了比较:菜油、精制豆油、粗豆油、棉子油,以葡萄糖为对照(*C. antarctica* 在葡萄糖中几乎不产胞外 MEL). 实验结果见图 1.

从图 1 可以认为,当 *C. antarctica* 在特定的疏水性基质植物油中可以较好地生产表面活性物质 MEL,在亲水性基质葡萄糖中则几乎不生产. 而以不同的植物油为碳源,*C. antarctica* 生产 MEL 的能力也各不相同,其生产能力依次为:精制豆油>棉子油>粗豆油>菜油. 根据这一结果,作者选取精制豆油作为发酵生产 MEL 的底物.

2.2 *C. antarctica* 的分批发酵动力学

2.2.1 豆油质量浓度对分批发酵的影响 采用不同质量浓度的豆油在 2 L 的台式发酵罐上进行了分批发酵实验,结果如表 1 所示.

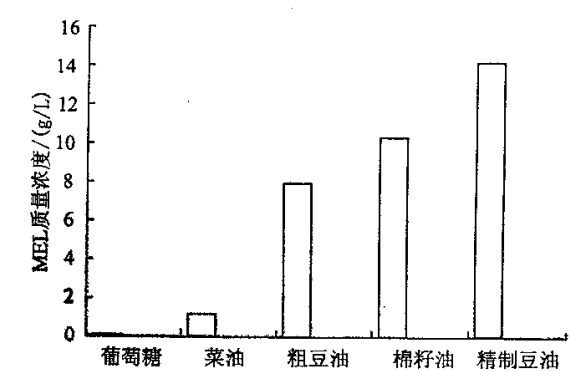


图 1 不同的植物油为碳源对 MEL 生产的影响
Fig.1 Effect of carbon sources (vegetable oils) on MEL production

表 1 豆油质量浓度对发酵的影响
Tab.1 Effect of soybean oil concentration on fermentation

豆油质量浓度/(g/L)	残油质量浓度/(g/L)	发酵时间/h
54	8.9	144
72	9.6	168
90	10.1	168
108	9.5	192

菌体干重/(g/L)	MEL 质量浓度/(g/L)	转化率/%
22.3	11.2	20.7
22.5	16.2	22.6
22.6	20.1	22.3
21.8	22.5	20.8

从表 1 可以看出,*C. antarctica* 在豆油质量浓度 72~90 g/L 范围内时,菌体生长较好,其转化率均在 22.3% 以上,通过上述底物质量浓度范围的菌体生长动力学实验可以发现,随着豆油质量浓度的提高,*C. antarctica* 达到最大菌浓的时间相应延迟,当豆油质量浓度为 108 g/L 时,其最大菌体浓度也有所下降,说明较高的豆油质量浓度对菌体的生长有一定的抑制作用. 而从 MEL 转化率来看,虽然当豆油质量浓度为 108 g/L 时转化率会有所下降(见图 2). 但仍能达到 20.8%,这表明较高的底物浓度下 *C. antarctica* 仍具有较强的利用与转化能力.

2.2.2 初始 pH 值对分批发酵的影响 pH 值对许多酶的催化反应以及细胞之间的特性传递过程有很大影响,pH 值的变化能改变体系中酶促反应的微环境和营养物的代谢流,使得诱导物与生长因子在活性与非活性之间变化. 作者分别在培养基初始 pH 值为 4.0,5.8 和 7.0 时进行分批发酵实验,结果见表 2.

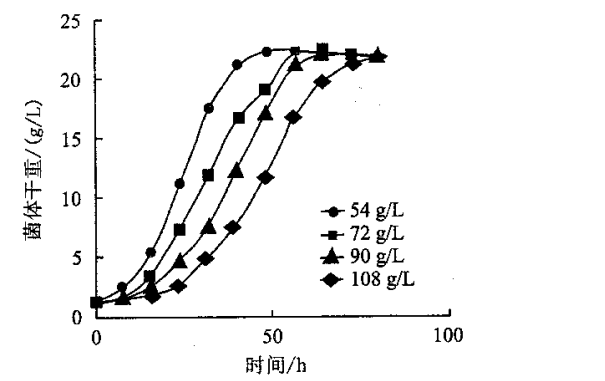


图 2 不同豆油质量浓度下的 *C. antarctica* 生长动力学

Fig.2 The kinetics of *C. antarctica* growth with various concentrations of soybean oil

表 2 初始 pH 对分批发酵的影响

Tab.2 Effect of initial pH on batch culture

初始 pH 值	残余底物质量浓度/(g/L)	发酵时间/h	菌体干重/(g/L)	转化率/%
4.0	10.2	168	20.8	21.1
5.8	8.6	168	21.6	22.5
7.0	10.8	168	20.5	20.7

从表中可以看出,不同初始 pH 值对 *C. antarctica* 的菌体生长和 MEL 的转化率影响不明显,初始 pH 值为 5.8 的转化率最高(22.5%)。发酵液的最终 pH 值都在 6.0 左右,表明 *C. antarctica* 对 pH 值具有很强的适应能力。

2.2.2.3 *C. antarctica* 分批发酵的菌体生长动力学

菌体的最大比生长速率 μ_m 和半饱和常数 K_s 是研究微生物动力学的两个重要参数,反映了微生物生长的一些基本特性。这两个参数的确定有多种方法,通常用连续培养方式来求解。由于连续培养需要严格的控制和检测手段,且培养过程中的消耗比较多,因此除连续培养外,也可以通过分批培养或流加培养来获得这两个参数。分批培养方法主要通过先拟合分批发酵数据,建立起能反映菌体生长动力学特性的数学模型,然后通过模型的求解来获得各动力学参数。鉴于实验条件和时间的限制,作者在研究 *C. antarctica* 的动力学特征时,从上述第二种方法出发,采用 Monod 方程的改进型——Andrews 模型确定了 *C. antarctica* 分批发酵菌体生长动力学模型,并通过实验得出了 μ_m 和 K_s 。由于随着豆油质量浓度的提高,菌体的生长受到一定程度的抑制,而在发酵过程中若存在基质对菌体生长有抑

制作用时,菌体生长的动力学特征通常用 Andrews 模型来描述^[6]:

$$\mu=\mu_m\left(\frac{S}{S+K_S}\right)\cdot\left(\frac{1}{1+S/K_I}\right)$$

μ :比生长速率(h^{-1}); μ_m :最大比生长速率(h^{-1});
 S :底物质量浓度(g/L); K_s :半饱和常数(g/L); K_I :底物抑制常数(g/L)。

用上式对分批发酵的实验数据(图 2)进行拟合,并用最小二乘法求解数学模型参数,计算结果见表 3。

表 3 *C. antarctica* 生长动力学模型参数

Tab.3 The parameters of growth kinetics model of *C. antarctica*

参数	μ_m/h	$K_S/(\text{g}\cdot\text{L})$	$K_I/(\text{g}\cdot\text{L})$
数值	0.11	0.73	105.4

因此,*C. antarctica* 分批发酵菌体生长的动力学模型可以表达为:

$$\mu=0.11\left(\frac{S}{S+0.73}\right)\cdot\left(\frac{1}{1+\frac{S}{105.4}}\right)$$

为考察模型的可靠性,将实验值和模型计算值进行了比较(图 3),发现模型与实验数据的拟合情况较好,这表明上述动力学模型能比较客观地描述 *C. antarctica* 在分批发酵时的生长情况,当 *C. antarctica* 以豆油为碳源进行菌体生长与 MEL 合成时,豆油质量浓度过低则不足以维持菌体生长,而豆油质量浓度过高则对菌体生长有一定的抑制,综合考虑上述因素,在分批发酵中适宜的豆油质量浓度为 9 g/dL 左右。

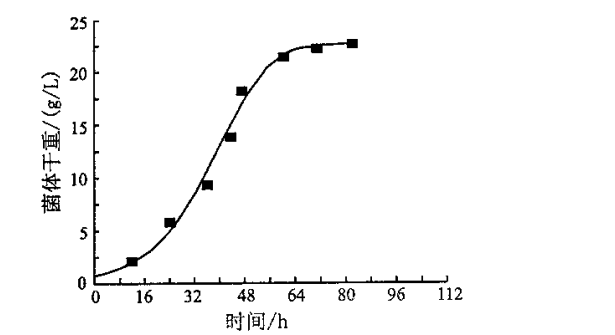


图 3 动力学模型计算值与实验值的拟合情况

Fig.3 Comparison between calculated values and experimental data of kinetics model

致谢:本研究得到华东理工大学生化反应器国家重点实验室的资助,作者谨在此表示衷心感谢!

(上接第 25 页)

参考文献

- [1] KOSARICN, CAIRNS W L, NEIL C. Biosurfactants and Biotechnology, Surface Science series [M]. New York : Marcel Dekker, 1987.
- [2] 方云,夏咏梅编译.生物表面活性剂[M].北京:中国轻工业出版社,1992.
- [3] KAWASHIMA H, SUGISAWA T, OOGAKI M et al. Extracellular production of a Mannosylerythritol Lipid by a mutant of Candida sp. From n-alkanes and triacylglycerols[J]. **J Ferment Technol**,1983, 61(2) :143~149
- [4] KITAMOTO D, AKIBA S, HIOKI T et al. Extracellular accumulation of Mannosylerythritol Lipids by a strain of Candida antarctica[J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54(1) 31~36.
- [5] KITAMOTO D, HANEISHI K, NAKAHARA T et al. Production of Mannosylerythritol Lipids by Candida antarctica from vegetable oils[J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54(1) 37~40.
- [6] 戚以政,汪叔雄编著.生化反应动力学与反应器[M].北京:化学工业出版社,1986.

(责任编辑:朱明)