

酵母菌 HL 的批次发酵及发酵动力学初探

刘淑君¹ 杨文博¹ 施安辉²

(南开大学微生物学系 天津 300071)¹ (山东大学生命科学院微生物系 济南 250100)²

摘要: 在摇瓶培养的基础上,对酵母菌 *Lipomyces starkeyi* HL 进行了小型发酵罐的分批和分批补料发酵及其发酵动力学的初步研究。结果表明,通过后期补料既可明显地延长菌体脂类合成期,减缓油脂比合成速率的降低,又可增加菌液的细胞密度,最终提高了整个发酵罐的油脂产量和平均容量产率。发酵结果如下:发酵时间 120h;油脂产量 11.0g/L;菌体生物量 19.4g/L;油脂百分含量 56.5%,显然比分批培养 84h 所得的 11.2g/L 细胞生物量和 6.1g/L 油脂产量分别增长了 73% 和 80%。此外,通过分批补料,获得了 0.09g/L·h 的油脂平均容量产率和 31.5mg/g·h 的最大油脂比合成速率。

关键词: 废糖液,油脂酵母菌 *L. starkeyi* HL,分批和分批补料培养,发酵动力学

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)-01-008-04

STUDIES ON THE BATCH-FERMENTENT AND THE FERMENTENT KINETICS OF YEAST-*L. STARKEYI* HL

LIU Shu-Jun¹ YANG Wen-Bo¹ SHI An-Hui²

(Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071)¹

(Institute of Microbiology, Shandong University, Jinan 250100)²

Abstract: Based on the flask culture conditions, the batch and fed batch of fermentor cultures were performed in

a small fermentor. The kinetics of growth and lipid producing were also studied, and the result indicated that using a fed-batch couldn't only prolong the period of lipid synthesis but also markedly retard the fast decreasing of specific lipid productivity after the time of sugar exhaustion. besides these, the cell density and the amount of lipid could also be increased. A content of 11.0g/L lipid and 19.4g/L dry biomass were determined at 120h and the cell contained 56.5% lipid by using a fed-batch at the later period of fermentation.

Key words: *L. starkeyi* HL, Waste sugar, Batch and fed batch of fermentor cultures, Kinetics of fermentation.

目前,以发酵法进行微生物油脂(即 SCO)的开发,其经济可行性主要在于底物消费和发酵罐消费,而这两者又主要取决于碳源的成本、油脂得率 $Y_{L/S}$ 和油脂容量产率(即 g lipid/L/h)。在摇瓶培养的基础上我们选育到了产脂高、生长快的优良酵母菌株,确定了最适培养温度、最佳氮源、最佳 C/N 及废糖液加入量。在此如果能探索出使发酵液含较高细胞密度的培养模型和尽可能高的油脂得率、油脂容量产率时,则能获得较高的油脂合成速率,也就能使以微生物发酵法获得油脂与从动、植物中获得油脂相竞争。此外,通过对 *L. starkeyi* HL 批次发酵动力学的初步研究,我们对它的油脂积累过程中各种参数的变化有了初步了解,为进一步研究它的恒速补料发酵和连续发酵奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

1.1.1 菌株:为本室保存的油脂酵母(*L. starkeyi*)经紫外线和 EMS(甲基磺酸乙酯)复合诱变筛选出的突变株,命名为 *L. starkeyi* HL。

1.1.2 培养基:斜面 YEPD 固体培养基:葡萄糖 20g,酵母浸膏 10g,蛋白胨 10g,琼脂 20g, pH 6.0,定容至 1L。平板培养基:同斜面 YEPD 固体培养基。液体种子培养基:葡萄糖 15g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, 酵母膏 1g, KH_2PO_4 7g, Na_2HPO_4 2g, MgSO_4 2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, $(\text{Na}_2)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ 10mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, 定容至 1L。废糖液发酵培养基:废糖液 165.7mL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.08g, KH_2PO_4 7g, Na_2HPO_4 2g, MgSO_4 2g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

81mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 9.3mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $(\text{Na})_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ 10mg, 定容至 1L。补加浓缩废糖液培养基,取原废糖液 121mL,在其中加入: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.08g, KH_2PO_4 10.5g, Na_2HPO_4 3g, MgSO_4 3g, 其它成分同废糖液发酵培养基,但要浓缩 5 倍,定容至 1L。

1.2 分析方法

1.2.1 生长测定^[1]:干重法:取一定量的培养液经 3000r/min 离心,蒸馏水洗涤两次,85℃ 烘干至恒重,称量干菌体。比色法:发酵液经适当稀释,在 570nm 处测光密度值。

1.2.2 残糖和残氮测定:分别用 Somogyi 法^[2]和靛酚蓝比色法^[3]。

1.2.3 油脂含量测定: Soxhlet 和 Folch 提取法^[4,5]。

1.2.4 菌体中脂肪滴观察:苏丹黑染色法^[6]。

1.2.5 废糖液中无机离子分析:岛津 RIA 气相色谱仪, Finnigan Mat212 型磁质谱仪。

1.3 种子液的制备

接一环菌于液体种子培养基中, 30℃、140r/min 摇床培养 24h。

1.4 发酵设备

BIOST* B 型 3L 发酵罐系统:发酵罐由德国 B. Braun 公司制造。该系统包括 3L 发酵罐、电极(溶氧电极、pH 电极、温度电极、消泡电极等)、控制器和微机。控制器根据各个电极采集的数据和各参数的设定值来对溶氧、温度、pH、消泡进行控制。

1.5 培养条件

1.5.1 分批培养: 3L 发酵罐装液系数为 0.6, 液体种子以 10% 的接种量接入发酵罐。用 5mol/L 的 NaOH 和 10% 的 HCl 自动调节 pH, 维持在 5.0 左右, T = 28℃, 溶氧 DO 维持在

20%以上(通过改变通气量和搅拌速率来控制)。发酵过程中定时取样测定菌液的 OD_{570} 、干重(X)、发酵液中还原糖和 NH_4^+ 的含量、油脂的含量,并用苏丹黑染色法在不同培养时间对菌体中脂滴进行涂片染色,最后在 OLYMPUS 显微镜下进行油镜观察、拍照。

1.5.2 分批补料培养条件:在分批发酵到 50h 向发酵罐中一次性补加了浓缩的新鲜培养液,其它条件同分批培养。

1.6 动力学参数的计算

1.6.1 比生长速率 μ (h^{-1}):

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

X...菌体浓度 (g/L), t...发酵时间 (h)

1.6.2 底物比消耗速率 Q_s (h^{-1}):

$$Q_s = (S_1 - S_2) / X / (t_2 - t_1)$$

S...葡萄糖浓度 (g/L)

X...菌体浓度 (g/L)

1.6.3 油脂的比生成速率 Q_p (mg/g/h):

$$Q_p = (P_2 - P_1) / (X - P) / (t_2 - t_1)$$

P...油脂浓度 (mg/L)

X - P...为菌体残余量 (g/L)

2 结果与讨论

2.1 分批培养条件下菌体生长及胞内油脂积累情况

为了探讨 *L. starkeyi* HL 的生长、底物消耗及产物生成动力学,进行了分批培养,发酵 84h,定时取样测定菌体浓度(X)、残糖的浓度(S)、残铵含量(N)及油脂产量(P),见图 1。并计算菌体的比生长速率 μ ,底物的比消耗速率 Q_s ,产物的比生成速率 Q_p ,得到 μ 、 Q_s 、 Q_p 随发酵时间(h)的变化曲线,见图 2。

由图 1 和图 2 可看出,油脂合成明显落后于菌体生长,整个发酵过程可分为菌体生长和产物积累两个阶段。在发酵开始 30h 后,就可观察到一个持续的油脂合成时期。从此时开始,菌体的 OD 值不再变化,但它的菌体生物量干重仍在增加。这种现象可以解释为:当发酵液中氮源耗尽时,菌体停止了生长、繁殖,但仍可吸收培养基中剩余碳源,而这些碳源基本上

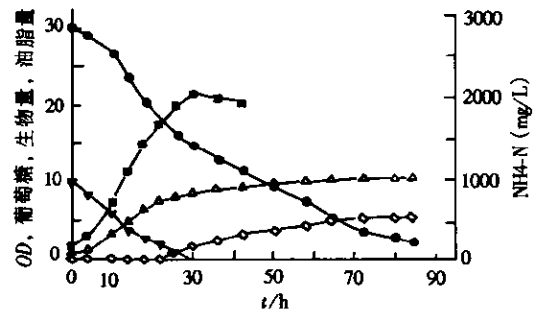


图1 分批培养下菌体的 OD_{570} 、生物量、油脂含量及发酵液中残糖、 NH_4^+ -N 含量的变化

■— $OD=570nm$, —○— 葡萄糖 (g/L), —△— 生物量 (g/L), —▼— NH_4^+-N (mg/L), —◇— 油脂量 (g/L)

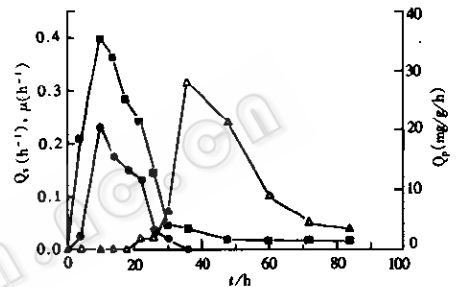


图2 分批培养中菌体 Q_s 、 μ 、 Q_p 的变化曲线

—■— Q_s (h^{-1}), —●— μ (h^{-1}), —△— Q_p (mg/g/h)

都被转化成胞内油脂储藏起来。此外,在发酵后期,因发酵液的粘度增大使通氧受限、或营养物质的缺乏等不利因素的影响有可能使菌体死亡,致使菌悬液的光密度稍有降低,这可通过增加搅拌转速和通气量以降低菌体因缺氧而造成的死亡率上升,也可以通过补料来增加产物合成期。鉴于此,下一步我们又进行初步的分批补料研究。

由图 2 还可看出,在培养到 22h 后,即氮源将被耗尽之时,菌体的比生长速率 (μ) 和碳源的比消耗速率 (Q_s) 都急剧降低。与此同时,菌体内的油脂比合成速率 (Q_p) 开始增加,经过一段时间, μ 逐渐降为零,而 Q_s 趋于恒定。但在油脂开始积累阶段 Q_s 要比菌体指数生长期时 Q_s 慢的多。这说明在油脂积累期,碳源是以很慢的比消耗速率被转化成胞内油脂的,进而也说明了为什么酵母油脂的积累需要约 50~84h 的如此长的培养时间。显而易见,如此长的培养时

间对菌体生长和油脂的积累这两阶段的完成是必须的,同时也证实正是因为氮源的缺乏才致使菌体的合成代谢转向了另一方面。

2.2 分批补料培养下菌体生长和胞内油脂积累情况

由图 3 和图 4 可以看出,菌体细胞密度和

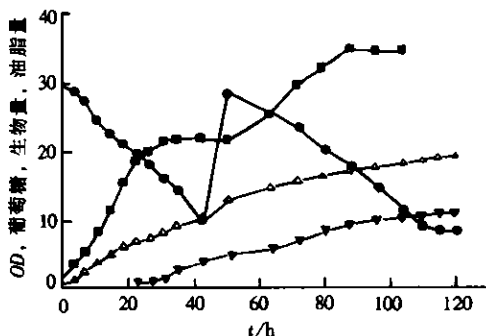


图3 分批补料培养下菌体OD、干重、油脂产量及发酵液中还原糖含量的变化

—■— OD=570nm, —●— 葡萄糖(g/L), —△— 生物量(g/L), —▼— 油脂量(g/L)

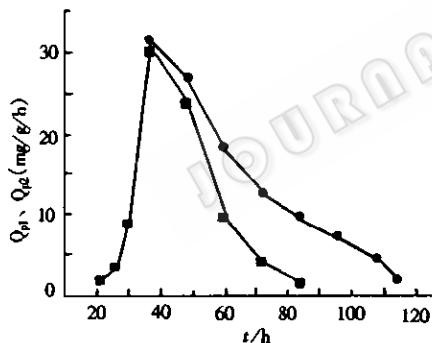


图4 分批、分批补料培养中油脂比合成速率

Q_{p1} , Q_{p2} 随培养时间的变化曲线

—○— Q_{p1} , —●— Q_{p2}

发酵罐的油脂产量可以利用分批补料培养来增加。在补料培养到 120h, 可得 19.4g/L 细胞生物量和 11.0g/L 油脂产量, 这明显比分批培养 84h 所得的 11.2g/L 细胞生物量和 6.1g/L 油脂产量要高, 分别增长了 73% 和 80%。此外, 通过分批补料, 获得了 0.09g/L/h 的油脂平均容量产率和 31.5mg/g/h 的最大油脂比合成速率。同时, 由

图 4 可以观察到, 在分批培养中, 当还原糖不足时, 菌体内 Q_p 降低较快, 而在分批补料培养中, 这种 Q_p 快速降低现象可以通过后期补料来延迟。但由图 3 又可看到, 在培养到 110h 后, 发酵液内剩余的葡萄糖不能再被菌体继续所吸收。这说明菌体在停止生长繁殖后吸收剩余的碳源转化成胞内油脂储存物也不是无限制的, 而是受菌体本身代谢活性和培养基中其它营养元素限制的。但总的来说, 可以通过分批补料适当地减弱各种不利因素的影响, 从而延长了 *L. starkeyi* HL 的油脂合成期, 最终增加油脂产量。

以上研究结果表明, 菌体油脂的积累除了其本身的生理特性外, 在很大程度上决定于培养基中的营养成分。此外, 通过后期补料的研究可以看到, 后期补料可以显著地延长油脂合成期和减缓油脂比合成速率的降低, 最终所获得的菌体生物量、油脂产量和油脂平均容量产率分别为 19.4g/L、11.0g/L 和 0.09g/L/h, 比分批培养都有相应地提高。通过对 *L. starkeyi* HL 分批、分批补料发酵动力学的初步研究, 我们对它的油脂积累过程中各种参数的变化有了初步的了解, 为进一步研究它的恒速补料发酵和连续发酵奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hiroaki Y. Journal of Fermentation and Technology 1983, 61(9): 275.
- [2] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1989, 36~39.
- [3] Z. 马钦. 元素分光光度法. 北京: 地质出版社, 1983, 334~337.
- [4] 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1989, 43~45.
- [5] Folch J M. Journal of Biology and Chemistry, 1957, 226: 497~509.
- [6] 白毓谦, 方善康, 高东等. 微生物实验技术. 济南: 山东大学出版社, 1987.