

供氧对产丙三醇假丝酵母产丙三醇发酵研究

金海如 方慧英 诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院 无锡 214036)

摘 要 研究了产丙三醇假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)产丙三醇及副产物与氧供给的关系。摇瓶试验发现其它营养条件一定,玉米浆添加量决定酵母量。在 0.4% 的玉米浆和装液比 0.08 时产丙三醇最高,副产物乙醇、乙酸和乙酸乙酯最小,玉米浆和装液比影响丙三醇和副产物的形成。在 5L 的反应器中以搅拌转速控制供氧水平,菌体生长阶段比耗氧速率为 28 mg/(g·h),在发酵阶段比耗氧速率 16 mg/(g·h)。适量供氧能得到高产率的丙三醇,而只产生微量的乙醇、乙酸和乙酸乙酯。

关键词 溶氧,丙三醇,产甘油假丝酵母,乙醇,乙酸,乙酸乙酯

中图分类号 Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)02-0203-04

丙三醇是一种重要的多羟基醇,俗称甘油,其用途广泛,如牙膏、烟草、化妆品、涂料工业和一些聚合物合成的基质和添加剂,也是食品、国防工业中的重要原料。我国由化学合成和油脂皂化水解两种途径生产的丙三醇满足不了市场需求,因此发展生物技术生产丙三醇势在必行^[1~4]。用产丙三醇假丝酵母(*Candida glycerolgenesis*)生产丙三醇是我国新产生的一个产业,国内发酵法丙三醇生产能力已超过年产 10 000t。

发酵条件对耐渗透压酵母产丙三醇及多元醇的影响已有众多的报道^[5~8]。Groleau 研究了酵母膏浓度和通风条件对鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)糖代谢的影响,发现不同的发酵条件下酵母代谢生成多元醇(包括丙三醇)或乙醇。Sahoo. D. K^[9]用假丝酵母(*Candida magnoliae*)定量研究了体积溶氧系数 K_La 对细胞生长、葡萄糖消耗和产物(丙三醇作为主要的多元醇)形成的影响。当 $K_La = 50/h$,产物多元醇产率最高,而副产物乙醇的形成随 K_La 减少。P. Vijai Kishore^[10]对粉质毕赤氏酵母(*Pichia farinosa*)进行了研究,认为溶解氧对丙三醇的合成有重要影响,维持 40% 饱和的溶氧水平可获得最佳的丙三醇产率。产丙三醇假丝酵母是耐高渗透压产丙三醇的一个假丝酵母新种^[11],本文研究氧的供给对降低该菌发酵副产物,提高发酵转化率的影响,对解决我国工业生产丙三醇中因

通风、原料(玉米浆质量)等物化参数不易控制而导致产率下降的问题有重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:产丙三醇假丝酵母由无锡轻工大学发酵甘油研究设计中心提供。

1.1.2 种子培养基:葡萄糖 10%,玉米浆 1%,尿素 0.2%。

1.1.3 发酵培养基:葡萄糖 25%,玉米浆 0.2%~0.8%,尿素 0.2%。

1.1.4 培养条件:发酵温度 30℃,HYG-Ⅱ 回转式恒温摇瓶柜转速 250 r/min。

1.1.5 发酵罐:5L 发酵罐,温度自动控制,自然 pH,溶氧在线显示。(Korea Fermentor Co. Ltd, Model:KF-5L)

1.2 分析方法

1.2.1 丙三醇和副产物的测定^[12]:上海分析仪器厂 1121-GC 气相色谱仪,φ4×1 m 不锈钢填充柱,氢焰离子化检测器,CDMC-1CX 型数据处理器,柱温 200℃,气化室 300℃,检测温度 240℃,柱前压力 0.34MPa,N₂、H₂ 和空气的流量调节至最佳,进样量 1 μL。丙三醇、乙醇、乙酸和乙酸乙酯使用分析纯,外标法定量。

1.2.2 酵母量:取离心后的细胞生理盐水洗涤两

次,80℃烘 20 h,测干重(dwt)。

1.2.3 还原糖:费林氏试剂法。以上所用化学试剂为分析纯。

2 实验结果

2.1 玉米浆用量与产丙三醇的关系

玉米浆中含有细胞合成所需的氨基酸、核酸、维生素、微量元素等营养物质,比酵母膏更为经济。如图 1 所示,在其它营养一定,玉米浆添加量 0.8%,发酵 72 h,残糖低,发酵速率快,但丙三醇含量较低,产率约 20%;而玉米浆添加量 0.1%,残糖较高,发酵速率慢,丙三醇含量也不高,0.4%玉米浆时丙三醇浓度和转化率最高。玉米浆的添加量和细胞量的关系如图 2(1~14 为试验号)所示,在较低玉米浆浓度时,提高浓度可以增加细胞量,玉米浆浓度大于 0.2%时细胞量增加较少可能是其它营养物浓度限制。用色谱分析其发酵产物(图 3),发现在 0.8%玉

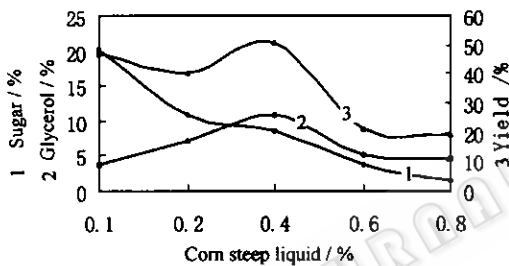


图 1 玉米浆添加量对丙三醇发酵的影响

Fig.1 The effect of corn steep liquid on glycerol fermentation

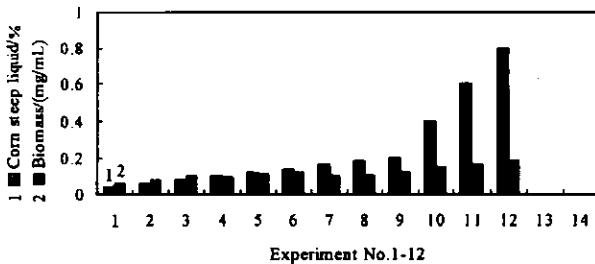


图 2 玉米浆与细胞量的关系

Fig.2 The relationship between the amount of corn steep liquid and biomass

米浆添加量时丙三醇产率较低的原因是乙醇、乙酸、乙酸乙酯等代谢副产物含量高(乙酸和乙酸乙酯重叠,其它小峰成分未确定),同时发现玉米浆添加量越低乙醇等副产物含量越少,丙三醇产率较高。在玉米浆添加量 0.4%,则产物丙三醇浓度最高,乙醇等副产物较少,转化率可达 51%。

2.2 不同装液比对产丙三醇假丝酵母产丙三醇的影响

在摇瓶发酵中装液比(装液量/三角瓶体积)往往能影响微生物发酵产物的积累。在一定的温度和转速下,装液比越小,体积传氧系数 K_La 越大^[13],供氧相对充分,越能满足其好氧需求。装液比对 *C. glycerolgenesis* 的最终细胞量影响较少,而是影响丙三醇的产率^[14]。装液比影响该酵母形成副产物和丙三醇的情况如图 4 所示,当装液比为 0.08,供氧相对充分,酵母产乙醇、乙酸、乙酸乙酯等其它副产物较少,丙三醇产率就高,相反随装液比增加至 0.16、0.24,乙醇及其它副产物多,丙三醇少,甚至产生的乙醇浓度 4.35% 大于丙三醇 2.85%。

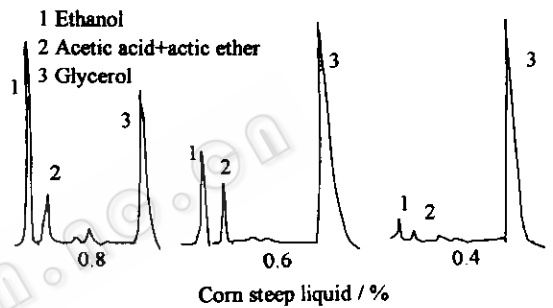


图 3 不同玉米浆添加量下产丙三醇假丝酵母部分发酵代谢产物色谱图

Fig.3 The chromatograph of some metabolites produced by *C. glycerolgenesis* under different amount of corn steep liquid

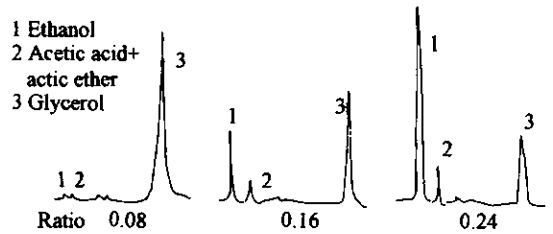


图 4 不同装液比下产丙三醇假丝酵母部分发酵代谢产物的色谱图

Fig.4 The chromatograph of some metabolites produced by *C. glycerolgenesis* under

2.3 溶氧水平对产丙三醇假丝酵母产丙三醇和乙醇的影响

在总容积为 5L 的反应器中控制通气量 0.18 m^3/m ,通过改变转速来控制发酵液中不同的 DO,其溶氧水平随发酵过程的变化如图 5,菌体氧的利用可以概略地分为两个阶段:在菌体生长阶段,随菌体量逐渐增加,溶氧水平急剧下降,用动态法计算得

菌体生长阶段比耗氧速率为 $28 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$; 在发酵阶段溶氧水平 DO 基本没有变化, 菌体发酵生成丙三醇的比耗氧速率为 $16 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

在不同搅拌速度下对丙三醇产生的影响如图 6 所示, 由实验发现, 搅拌速度为 $400 \text{ r}/\text{min}$ 时, 发酵过程相应的 DO 约为零, 反应器满足不了细胞摄氧的需求, 酵母就大量产生副产品乙醇(乙醇的变化曲线图略), 丙三醇产率低, 明显影响丙三醇的转化率; 在搅拌转速为 $500 \text{ r}/\text{min}$ 的发酵过程中, 相应的溶氧浓度为 $2\sim 3 \text{ mg}/\text{L}$, 产丙三醇最高达 $121 \text{ g}/\text{L}$, 副产品乙醇也较少; 随着转速的增加, 溶氧浓度越高,

但丙三醇产率并没有增加。

3 讨 论

由实验现象分析发现产丙三醇假丝酵母在一定的供氧下, 玉米浆影响丙三醇和乙醇的产生。在摇瓶发酵实验中, 一定的玉米浆添加量决定酵母细胞量(图 2), 而不同装液比对细胞量影响较少^[14], 不同供氧速率决定了代谢产物的种类和数量。这样可以推测其它条件一定时, 玉米浆添加量影响酵母细胞量, 而细胞量的多少一方面影响发酵速度, 另一方面在一定的发酵条件中影响单位细胞所得到的氧, 细胞量越多则单位细胞浓度所得到的氧越少, 酵母细胞为了维持代谢就必须利用其它的中间代谢产物作为电子受体得到能量, 于是就产生乙醇等代谢副产物, 从而形成不同丙三醇转化率, 这是玉米浆对酵母发酵影响的本质(图 1), 所以在一定装液比下只有在较适的玉米浆才可达到较佳的丙三醇发酵产率。产丙三醇假丝酵母在利用糖产生代谢产物时, 供氧丰富乙醇、乙酸乙酯等副产物产生少, 丙三醇产生多; 当氧供给不足时就产生乙醇、乙酸乙酯等副产物, 丙三醇产率低。

通过控制发酵条件满足产丙三醇假丝酵母发酵需氧量可以提高丙三醇产率, 降低乙醇等副产物的形成。在发酵过程当玉米浆浓度确定, 则细胞量一定, 维持菌体生长的比耗氧速率为 $28 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 丙三醇发酵的比耗氧速率为 $16 \text{ mg}/(\text{g}\cdot\text{h})$, 就能降低副产物乙醇, 稳定丙三醇产率达 51% 以上。

此外随着酿酒酵母丙三醇合成途径上的深入研究, 通过调节丙三醇合成关键酶也能提高丙三醇产率, 降低副产物乙醇的形成^[15]。在产丙三醇假丝酵母中有望采用诱变或基因工程调节丙三醇合成关键酶提高产率。

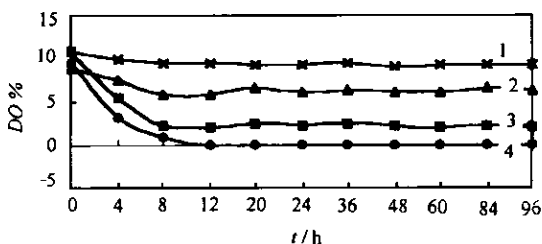


图 5 搅拌转速对发酵过程 DO 的影响

Fig. 5 The effect of speed of rotation on the level of dissolved oxygen in medium during fermentation process

Speed of rotation(r/min): 1. 800; 2. 600; 3. 500; 4. 400

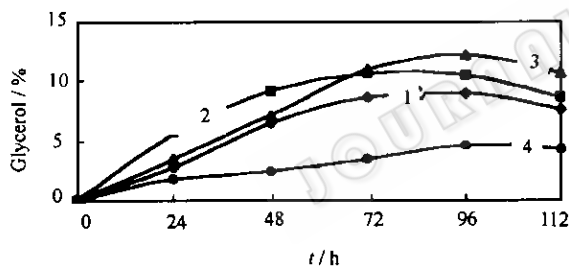


图 6 搅拌转速对产丙三醇假丝酵母产丙三醇的影响

Fig. 6 The effect of speed of rotation on glycerol fermentation of *C. glycerolgenensis*

Speed of rotation(r/min): 1. 800; 2. 600; 3. 500; 4. 400

参 考 文 献

- [1] 诸葛健, 方慧英. 食品与发酵工业, 1994, 4: 65~70
- [2] 诸葛健, 方慧英, 诸葛斌. 工业微生物, 1997, 27(3): 34~36
- [3] 叶敏铭. 日用化学工业, 1989, 4: 30~33
- [4] 元富升. 现代化工, 1996, 1: 36~39
- [5] Denis Grolean, Pierre Chevalier etc. *Biotechnology Letters*, 1995, 17(3): 315~320
- [6] Sumio Michnick, Jean-Michel Salmon. *Journal of Industrial Microbiology*, 1994, (13): 17~23
- [7] Vijaikishore P, Karanth N G. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1986, 13: 189~205
- [8] Hajny G J. *Applied Microbiology*, 1960, 8: 5~11
- [9] Sahoo D K. *Indian Chem Eng*, 1990, 32(1), 75~81

- [10] Vijaikishore P, Karanth N G. *Process Biochemistry*, 1986, 21(10):160~163
- [11] 王正祥, 诸葛健, 方慧英. *微生物学报*, 1999, 39(1):68~74
- [12] 苗延林. *酿酒科技*, 1994, 4:37~38
- [13] 范代娣. *生物工程学报*, 1994, 10(2):114~117
- [14] 杨海麟, 诸葛健. *无锡轻工大学学报*, 1997, 16(4):16~21
- [15] Nevoigt & Stahl U. *Yeast*. 1996. 12:1331~1337

The Effect of Oxygen Supply on Production of Glycerol with *Candida glycerolgenesis*

JIN Hai-Ru FANG Hui-Ying ZHUGE Jian

(School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract The relationship between oxygen supply and production of glycerol or byproduct with *Candida glycerolgenesis* have been studied. The experiments in shake flasks indicated that the biomass was determined by the concentration of corn steep liquor when other fermentation condition was constant, the concentration of corn steep liquor and the ratio of the volume of the medium to the capacity of the flask affected the yield of glycerol and other byproducts because of different oxygen supply. With 0.4% corn steep liquid and the ratio of the volume of the medium to the capacity of the flask was 0.08, the yeast yielded higher level of glycerol concentration and little other byproducts, while oxygen was insufficient for glycerol production such as the ratio was 0.24, the yeast would produce much more alcohol and other byproduct, then decreased the yield of glycerol. In the fermentation process of 5L fermentor, agitator speed mostly affected the DO level in the medium. In growth phase the specific oxygen consumption rate of *C. glycerolgenesis* was 28 mg/(g·h), and during fermentation process it was 16 mg/(g·h). With suitable oxygen supply, *C. glycerolgenesis* can produce high level of glycerol whereas ethanol and other byproducts was nearly zero.

Key words Oxygen, *Candida glycerolgenesis*, glycerol, ethanol, acetate, acetic ether