

一株凝结芽孢杆菌产生糖脂的工艺研究*

郑喜群 刘晓兰 张鹭 马微

(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院 齐齐哈尔 161006)

摘要: 对分离出的一株凝结芽孢杆菌生产糖脂的摇瓶发酵工艺进行了优化和 10L 罐发酵实验。适宜发酵条件为: 培养基由 6% 豆油、3.5g/L NaNO_3 、0.75g/L 酵母膏以及一定量的无机盐组成, 发酵温度 30℃, 初始 pH8.5, 搅拌转速 150 ~ 240r/min, 发酵周期 96h。糖脂产量达到 7.073g/L。

关键词: 糖脂, 生物表面活性剂, 发酵, 凝结芽孢杆菌

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0012-05

A STUDY ON BIOTECHNOLOGY OF GLYCOLIPID PRODUCED BY A *BACILLUS COAGULANS*

ZHENG Xi-Qun, LIU Xiao-Lan, ZHANG Lu, MA Wei

(College of Life Science and Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006)

Abstract: The biotechnology of glycolipid fermented by a *bacillus coagulans* was studied and the fermentation process in 10L bioreactor was conducted. Suitable medium contained 6% bean oil as carbon source, 3.5g/L NaNO_3 as nitrogen source, 0.75g/L yeast extract and some inorganic salts. The fermentation temperature of 30℃, initial pH of 8.5, stirring revolution of 150 ~ 240r/min and fermentation period of 96h proved to be optimal. The yield of glycolipid in 10L

* 黑龙江省教委资助项目

收稿日期: 2000-04-30, 修回日期: 2000-07-28

bioreactor was 7.073g/L.

Key words: Glycolipid, Biosurfactant, Fermentation, *Bacillus coagulans*

生物表面活性剂与一般表面活性剂分子在结构上相似,既含有极性的亲水基,又含有非极性的疏水基。糖脂是最重要的一类生物表面活性剂。在糖脂分子中,糖是作为亲水基,而脂肪酸或羟基脂肪酸的烷基部分是疏水结构。近年来,生物表面活性剂在各种工业,尤其是在三次采油中的应用,促进了它的研究与发展^[1-5]。

本课题组分离筛选到一株糖脂产生菌,其细胞形态、培养特性和生理生化特性,基本上与凝结芽孢杆菌一致。本文报道该菌产生糖脂的摇瓶实验和10L发酵罐实验结果。

1 材料与方法

1.1 菌种

本课题组从炼油厂附近油污土样中分离筛选纯化而来。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 斜面培养基:营养琼脂培养基。

1.2.2 种子培养基: NaNO_3 12g, KH_2PO_4 0.875g, K_2HPO_4 1.125g, MgSO_4 1.5g, MnSO_4 0.01g, FeSO_4 0.015g, 酵母膏 0.75g, 定容 1L, 豆油 6%, pH 7.0。

1.2.3 发酵培养基: NaNO_3 2.5 ~ 4.5g, KH_2PO_4 0.225 ~ 1.575g, K_2HPO_4 0.275 ~ 2.025g, MgSO_4 1.5g, MnSO_4 0.01g, FeSO_4 0.015g, 酵母膏 0.75g, 定容 1L, 豆油 6%, pH 7.0 ~ 8.5。

1.2.4 培养方法:斜面 30℃ 恒温培养 24h, 制成菌悬液, 接种到种子培养基中, 30℃ 摇床 (60r/min) 培养 36h, 再接种到发酵培养基。

1.3 测定方法

1.3.1 糖脂的提取和定性定量测定: 发酵液用三氯甲烷: 甲醇 (v: v = 2: 1) 溶剂提取, 减压蒸干, 得粗产品。定性鉴定用硅胶薄层层析法, 展开剂: 三氯甲烷: 甲醇: 醋酸为 80: 25: 1, 显色剂: α -萘酚, 蓝灰色, 显糖; 2, 7-二氯荧光黄, 黄色荧光, 显脂^[6,7]。定量测定用苯酚-硫酸法^[8]。

1.3.2 菌体浓度的测定: 比浊法。取 5mL 发酵液, 10,000r/min 离心 20min, 弃去上清液, 用 5mL 蒸馏水均匀悬浮沉淀的菌体, 在 620nm 测定光密度。

1.3.3 表面张力和界面张力的测定: 滴体积法^[9]。

2 结果与讨论

对分离纯化的菌株进行了初步鉴定, 该菌为革兰氏阳性, $0.5 \sim 1.0\mu\text{m} \times 2.5 \sim 3.0\mu\text{m}$, 有中生或近中生的椭圆或柱状芽孢, 孢囊不膨大, 周生边毛, 可运动, 无荚膜, 不抗酸, 能发酵豆油、色拉油形成稳定的乳化液。其细胞形态、培养特性和 95% 的生理生化特性与凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*) 一致。

2.1 碳源

最适碳源是油性基质, 它们能诱导生物表面活性剂的产生^[5]。以 6% 豆油为碳源。

2.2 氮源

氮源的浓度控制对微生物的生长和糖脂的产生起着重要作用^[5]。测定了该菌在 NaNO_3 浓度为 2.5、3.0、3.5、4.0 和 4.5g/L 的培养液中产生糖脂的动态。产物在发酵 120~144h 分别达最高值, 以 NaNO_3 浓度为 3.5g/L 时为最高 (4.26g/L), 乳化程度较其它的好, 液体呈乳白色。油镜观察菌体呈长链, 菌体体积小, 菌体均含有芽孢。表 1 为培养基 NaNO_3 浓度为 3.5g/L 时的实验结果。可以看出, 表面张力, 界面张力和 pH 值随糖脂产量的增大而不断降低。

表 1 表面张力、界面张力和 pH 随发酵时间的变化

时间 (h)	糖脂产量 (g/L)	表面张力 (mN/m)	界面张力 (mN/m)	pH
24	0.68	45.71	3.98	7.5
48	1.40	44.11	3.84	7.5
72	2.01	42.59	3.59	7.0
96	2.73	40.05	3.27	7.0
120	4.02	36.51	3.48	6.5
144	4.26	36.51	3.18	6.5
168	3.44	35.87	3.12	6.5
192	3.02	35.87	3.12	6.5

注: 25℃测得水 $V=0.032$, 其中 $\gamma=1.29\text{mm}$

表 2 正交试验结果

试号	MgSO_4 (g/L)	MnSO_4 (g/L)	FeSO_4 (g/L)	酵母膏 (g/L)	pH	糖脂产量 (g/L)
1	1.0	0.001	0.010	0.50	6.5	1.421
2	1.0	0.005	0.015	0.75	7.0	0.746
3	1.0	0.010	0.020	1.00	7.5	4.718
4	1.0	0.015	0.025	1.50	8.5	1.156
5	1.5	0.001	0.015	1.50	7.5	1.095
6	1.5	0.005	0.010	1.00	8.5	6.011
7	1.5	0.010	0.025	0.75	6.5	1.168
8	1.5	0.015	0.020	0.50	7.0	1.023
9	2.0	0.001	0.020	0.75	8.5	3.606
10	2.0	0.005	0.025	0.50	7.5	1.625
11	2.0	0.010	0.010	1.50	7.0	0.722
12	2.0	0.015	0.015	1.00	6.5	4.655
13	2.5	0.001	0.025	1.00	7.0	1.023
14	2.5	0.005	0.020	1.50	6.5	4.791
15	2.5	0.010	0.015	0.50	8.5	2.108
16	2.5	0.015	0.010	0.75	7.5	2.289
K1	8.041	7.145	10.443	6.177	12.032	
K2	9.297	13.173	8.604	7.809	3.514	
K3	10.608	8.716	14.138	16.407	9.727	
K4	10.211	9.123	4.972	7.764	12.881	
R1	2.567	6.028	9.116	10.230	9.367	

1.0g, 定容 1L, 豆油 6%, pH 8.5。接种后, 在 30℃的 60r/min 摇床上, 培养 6d, 实验

2.3 磷源

磷酸对菌体生长和糖脂的产生非常重要。菌体中一部分磷构成核酸和磷脂, 许多辅酶都含有磷酸, 磷参与碳水化合物代谢主要步骤的磷酸化过程, 生成高能磷酸化合物。磷酸又是重要的 pH 缓冲剂之一。测定了该菌在磷源 ($\text{K}_2\text{HPO}_4 : \text{KH}_2\text{PO}_4 = 1.28 : 1$) 浓度为 1.6、1.8、2.0、2.2 和 2.4g/L 的培养液中产生糖脂的动态。当磷源含量为 2.0g/L 时, 糖脂的产量最高 (4.778g/L)。

2.4 培养基中其它因素对菌体产生糖脂量的影响

MgSO_4 , FeSO_4 , MnSO_4 是微生物生命活动不能缺少的物质; 酵母膏中含有丰富的碳源、氮源、磷源、无机盐离子和生长因素, 这些成分都能促进菌体的生长和繁殖; 而 pH 值与微生物生命活动关系密切, 它影响原生质膜所带电荷的极性和渗透性等, 这 5 种因素还有协同作用。因此在适宜氮源、磷源确定的基础上, 对这 5 个因素做 L_{16} (4^5) 正交试验。试验结果如表 2 所示。比较这 5 个因素的极差, 可知各因素的主次顺序为: $D \rightarrow E \rightarrow C \rightarrow B \rightarrow A$, 较优的工艺条件是 $A_3B_2C_3D_3E_4$ 。

2.5 较优培养条件下的摇瓶实验

较优培养基条件是: NaNO_3 3.5g, KH_2PO_4 0.875g, K_2HPO_4 1.125g, MgSO_4 2.0g, MnSO_4 0.005g, FeSO_4 0.02g, 酵母膏

结果如表3所示。可以看出, 糖脂产量随着菌体生长而增加, 在发酵120h糖脂产量达到6.953g/L。当菌体的数量逐渐降低时, 糖脂产量也开始下降, 这说明糖脂产生和菌体生长是偶联型关系。随着糖脂产量的提高, 表面张力逐渐降低, 最低表面张力34.33mN/m。这是因为糖脂是胞外产物, 它集亲水基和憎水基结构于一身, 具有较好的表面活性, 有助于油-水的乳化。

2.6 10L 发酵罐实验

用10L通用式机械搅拌通风发酵罐在上述优化培养条件下进行流加碳源发酵实验, 发酵罐装液系数75%, 碳源分6次加入, 罐压0.05MPa, 搅拌转数150~240r/min。图1是发酵进程曲线。可以看出, 10L罐发酵周期较摇瓶发酵周期缩短1d, 适宜发酵时间为96h, 最高糖脂产量为7.073g/L, 发酵液最低表面张力32.01mN/m。发酵液溶氧浓度始终处于1.5%~2.9% (25℃饱和氧的水溶液溶氧为100%) 的低水平, 且每次流加碳源后, 溶氧浓度稍有下降, 而后又逐渐上升, 发酵后期溶氧浓度下降到0.1%。这表明该菌生长及合成糖脂的临界溶氧浓度很低, 非常有利于溶氧浓度低水平的水不溶性基质为底物的大型罐深层发酵。

表3 适宜培养条件下摇瓶实验结果

时间 (h)	糖脂量 (g/L)	菌体量 (OD_{600})	表面张力 (mN/m)	pH
24	0.800	1.03	46.65	8.5
48	2.275	1.58	43.60	8.5
72	3.110	2.26	40.51	8.0
96	4.383	2.61	38.49	8.0
120	6.953	2.94	35.42	7.5
144	5.787	2.64	34.33	7.5

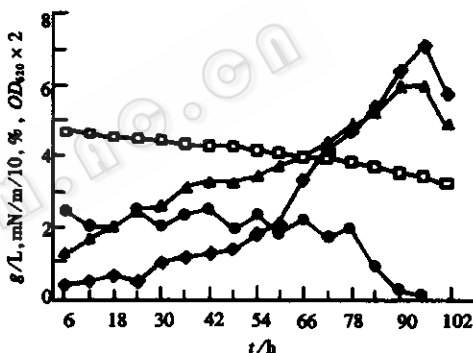


图1 10L发酵罐流加碳源发酵进程曲线

—■—糖脂量 g/L, —□—表面张力 mN/m,
—▲—菌体浓度 OD_{600} , —●—溶氧浓度 %

参考文献

- [1] Ivshina I B, Kuyukina M S, Philip J C, *et al.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1998, 14: 711 ~ 717.
- [2] Georgiou G. Biotechnology, 1992, 10: 60 ~ 65.
- [3] Ghurye G L, Vipulanandan C, Willson R C. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 44: 661 ~ 666.
- [4] 夏咏梅, 方云. 日用化学工业, 1999, 1: 27 ~ 31.
- [5] 方云, 夏咏梅. 生物表面活性剂, 北京: 中国轻工业出版社, 1992.
- [6] 薛燕芬, 王修坦. 微生物学报, 1989, 29 (1): 75 ~ 77.
- [7] 李祖义, 施岳屏, 夏寅, 等. 生物工程学报, 1986, 2 (1): 47 ~ 51.
- [8] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K, *et al.* Analytical Chemistry, 1956, 28 (3): 350 ~ 356.
- [9] 张亮生, 王慎民. 精细化工实验指导, 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 1984, 67 ~ 68.