

表面活性剂

应用煎炸废油发酵制备槐糖脂生物表面活性剂

刘佳铭^{1,2}, 李俊峰³, 梁生康^{1,2*}, 朱茂旭^{1,2}, 李正嵩^{1,2}, 杨燕群^{1,2}

(1. 中国海洋大学 化学化工学院, 山东 青岛 266100; 2. 中国海洋大学 海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室, 山东 青岛 266100; 3. 青岛科技大学 海洋科学与生物工程学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 应用正交实验, 优化了假丝酵母菌 O-13-1 以煎炸废油为油溶性碳源发酵制备槐糖脂的条件, 并应用高效液相色谱-高分辨串联质谱 (HPLC-MS/MS) 鉴定了所产槐糖脂同系物的组成及结构。结果表明, 经正交实验优化的 O-13-1 菌株以煎炸废油为底物制备槐糖脂的摇瓶发酵条件为: 摇床转速 200 r/min, 双碳源质量浓度均为 90 g/L, 温度为 25 °C, 接种量为体积分数 12%。在此条件下, 槐糖脂产量达到最大, 为 73.26 g/L; O-13-1 菌株以煎炸废油为底物所合成槐糖脂由 9 种乙酰基取代的内酯型和酸型槐糖脂同系物构成, 内酯型槐糖脂同系物所占质量分数达 76%。基于摇瓶得到的以煎炸废油为油溶性碳源的优化发酵条件, O-13-1 菌株在 5 L 自动发酵罐中转速 500 r/min 时发酵合成槐糖脂产量可达 163.28 g/L。以煎炸废油为碳源发酵槐糖脂的原料成本较普通大豆油降低 18%, 在有效降低槐糖脂生产成本的同时, 实现了煎炸废油的资源化利用。

关键词: 槐糖脂; 假丝酵母菌; 煎炸废油; 发酵; 条件优化; 表面活性剂

中图分类号: TQ423 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2018) 06-0949-07

Utilization of Waste Fried Oil for Production of Sophorolipid Biosurfactants by Fermentation

LIU Jia-ming^{1,2}, LI Jun-feng³, LIANG Sheng-kang^{1,2*}, ZHU Mao-xu^{1,2},
LI Zheng-song^{1,2}, YANG Yan-qun^{1,2}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China; 2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266100, Shandong, China; 3. College of Marine Science and Biological Engineering, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, Shandong, China)

Abstract: The synthesis conditions of sophorolipids (SLs) by *Candida bombicola* O-13-1 fermentation with waste fried oil (WFO) as lipid substrates were optimized through orthogonal experiment, and the composition and structure of the products were identified by HPLC-MS/MS. The results showed that the optimized conditions in shake-flask were determined as follows: speed of agitation 200 r/min, carbon source added amount 90 g/L, temperature 25 °C, inoculum size 12% (volume fraction). The highest yield of SLs (73.26 g/L) was obtained at above conditions. The products were composed of 9 kinds of acetylated lactonic SLs and acidic SLs, in which, the lactonic SLs accounted for up to 76% (mass fraction). Moreover, the yield of SLs was as high as 163.28 g/L in a 5 L automatic fermentor under the optimized conditions of shake-flask with the exception of 500 r/min. The material cost for the synthesis of SLs by fermentation with WFO as carbon source was 18% lower than that with soybean oil as carbon source, and the resource utilization of WFO could be realized while effectively reducing the production cost of SL.

Key words: sophorolipids; *Candida bombicola*; waste fried oil; fermentation; optimization of conditions; surfactants

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (41371314); Science and Technology

收稿日期: 2017-05-16; 定用日期: 2017-10-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20170416

基金项目: 国家自然科学基金 (41371314); 山东省科技发展计划项目 (2015GSF121030); 山东省重点研发计划 (2017GHY15117); 山东省高等学校科技计划项目 (J14LE59)。

作者简介: 刘佳铭 (1993—), 女, 硕士生。联系人: 梁生康 (1972—), 男, 教授, 电话: 0532-66786355, E-mail: liangsk@ouc.edu.cn。

Development Plans of Shandong Province (2015GSF121030); Key Research and Development Program of Shandong Province (2017GHY15117); Project of Shandong Province Higher Educational Science and Technology Program (J14LE59)

槐糖脂是一类主要由酵母菌产生的糖脂类生物表面活性剂^[1],与化学合成表面活性剂相比,其不仅具有高效的表(界)面活性和优良的增溶乳化性能,而且具有低毒、易于生物降解等良好的环境相容性,可望作为一种绿色表面活性剂应用于日化、食品、石油开采、医药、环境保护等行业。目前,限制槐糖脂工业化应用的主要因素是发酵成本过高,其中,发酵培养基成本约占生物表面活性剂总生产成本的 50%^[2],选用廉价发酵底物是降低其生产成本的有效手段。假丝酵母菌(*Candida bombicola*)是槐糖脂主要产生菌种之一,一般以亲水性碳源和油溶性碳源双碳源进行发酵,前者通常为葡萄糖,主要在发酵早期用于菌体生物量的生长,油溶性碳源包括油酸、菜籽油乙酯、大豆油等,一般在菌株生长达到稳定期后一次性或连续加入,主要为菌株合成槐糖脂提供疏水基团,即长链脂肪酸^[3-4]。油溶性碳源作为槐糖脂发酵原料的重要组成,是决定其成本的关键要素^[5]。尽管以普通植物油为碳源发酵槐糖脂产量较高,但价格昂贵,选用廉价或废弃的油脂为油溶性底物发酵制备槐糖脂,是降低槐糖脂发酵原料成本的有效途径。

在食品加工过程中,会产生大量的煎炸废油,其通常具有较高含量的游离脂肪酸^[6],且易于集中回收,适合作为油溶性底物应用于槐糖脂的发酵。目前,已有文献报道,将煎炸废油应用于槐糖脂发酵,但获得的产量远远低于以普通植物油为碳源时的产量^[7-8]。实际上,发酵产量与生产菌种性能、培养基组成及发酵条件等密切相关,需要针对特定菌种优化其发酵工艺。

本文以课题组筛选的假丝酵母菌 O-13-1 为槐糖脂产生菌,通过摇瓶培养实验,应用正交实验设计方法,优化了该菌株以煎炸后的废大豆油为油溶性碳源合成槐糖脂的发酵条件,包括摇床转速、培养温度、碳源质量浓度和接种量,在此基础上,应用 5 L 自动发酵罐评价该菌种以煎炸废油为底物发酵生产槐糖脂的潜力;同时,以煎炸前的普通大豆油为对照,应用 HPLC-MS/MS 比较了该菌株以煎炸前、后两种油脂分别作为油溶性碳源所产槐糖脂同系物的组成及结构。研究结果可为以煎炸废油为底物工业化发酵生产槐糖脂提供依据。

1 实验部分

1.1 菌株

槐糖脂发酵菌株:假丝酵母菌 O-13-1,为本课题组筛选得到,并在 4 °C 下保藏。

1.2 试剂及仪器

所用试剂均为 AR 或色谱纯,其中,大豆油、煎炸废油由中国海洋大学第二食堂提供,煎炸废油是由大豆油在 150~180 °C 下连续煎炸 2~3 h 后收集获得,煎炸物包括鸡肉、猪肉、鱼肉、面团等。

THZ-98C 恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司); BIOTECH-5BG 玻璃发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司); 6890N 型气相色谱仪、1290 HPLC-Bruker Maxis Q-TOF 型高效液相色谱-高分辨串联质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

1.3 培养基

1.3.1 种子及斜面培养基

种子培养基:葡萄糖, 20 g/L; 蛋白胨, 20 g/L; 酵母粉, 10 g/L。在 115 °C 下灭菌 30 min。

斜面培养基为在上述液体种子培养基中添加 20 g/L 琼脂粉的产物。

1.3.2 发酵培养基

酵母粉, 2.5 g/L; 柠檬酸钠, 5 g/L; MgSO₄·7H₂O, 4 g/L; (NH₄)₂SO₄, 2 g/L; KH₂PO₄, 1 g/L; NaCl, 0.1 g/L; 无水 CaCl₂, 0.1 g/L; 葡萄糖, 60~120 g/L; 煎炸废油, 60~120 g/L, 具体用量在各批次摇瓶和发酵罐培养中标明。在 115 °C 下灭菌 30 min。

1.4 培养方法

1.4.1 液体种子液培养

从保藏菌种的斜面培养基上刮取一环菌苔接入 250 mL 装有 50 mL 种子培养基的三角瓶内,在 160 r/min、30 °C 条件下培养 24 h。

1.4.2 摇瓶培养

250 mL 三角瓶内装 50 mL 发酵培养基,以课题组前期优化的以大豆油为底物发酵槐糖脂的摇瓶培养条件,即水溶性碳源葡萄糖的质量浓度为 60 g/L,按体积分数 5% 接种量接入种子液,在 200 r/min、30 °C 下培养 24 h 后,添加 90 g/L 的普通大豆油作为油溶性碳源继续培养。发酵结束后收集槐糖脂,以进行槐糖脂同系物组成及结构分析。

与上述培养方式相同, 以煎炸废油为底物进行摇瓶发酵, 定时取样测定生物量、残糖、残油、残氮及槐糖脂含量。

1.4.3 摇瓶培养条件正交实验设计

Daverey^[9]等研究表明, 在培养基组分确定情况下, 摇床转速、培养温度、碳源质量浓度和接种量 4 个因子是影响假丝酵母菌 ATCC 22214 生物合成槐糖脂的主要因素。因此, 本文以这 4 个参数作为优化因子, 并通过各因素响应值曲线中的拐点或趋于稳定点对应的水平值, 选定各因素的水平及区间, 其中, 水溶性碳源与油溶性碳源的质量浓度比为 1 : 1 (如碳源质量浓度为 60 g/L, 则代表葡萄糖和煎炸废油的质量浓度均为 60 g/L)。采用 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 的同水平正交表设计实验^[10], 优化条件的因素水平见表 1, 每个实验方案做平行样。

表 1 因素水平表

Table 1 Level of factors in $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	摇床转速/ (r/min)	培养温度/ ℃	碳源质量浓度/ (g/L)	接种量 体积分数/%
1	160	25	60	4
2	200	30	90	8
3	240	35	120	12

1.4.4 5 L 自动发酵罐培养实验

在 5 L 自动发酵罐内装入 2 L 发酵培养基, 发酵条件按正交实验所得最优条件进行设置。由于摇瓶培养和发酵罐培养转速设置存在差异, 为探究适宜的 5 L 发酵罐转速条件, 将发酵罐转速分别设置为 400、500、600 r/min, 曝气量均为 3 L/min, 煎炸废油在接种后的 16、40、64、88 h 分批加入, 监测转速 400 r/min 的发酵过程中菌体生物量的变化。按 BIOTECH-5BG 玻璃发酵罐说明书要求对溶氧电极进行零点标定和斜率标定。零点标定是将电极浸没于饱和无水亚硫酸钠溶液中, 待溶氧值稳定后标零点; 斜率标定是在发酵前、温度罐压通气量均已正常情况下, 以 100% 标定。发酵过程温度、溶氧等参数的监测频率为 1 次/min, 温度的检测精度为 0.1 ℃。

1.5 分析方法

1.5.1 生物量、残油量、槐糖脂含量的测定

取 50 mL 发酵液在 8000 r/min 下离心 10 min, 收集到的菌体细胞烘干至恒重, 称重即得生物量。上清液用等体积的正己烷和乙酸乙酯分别萃取 2 次, 40 ℃ 减压蒸馏除去有机溶剂, 称重分别得到残油量和槐糖脂粗产物含量。

1.5.2 残糖的测定

DNS 法测定^[11]。

1.5.3 残氮的测定

碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法测定^[12]。

1.5.4 油脂脂肪酸组分鉴定

应用硫酸-甲醇法分别对普通大豆油、煎炸废油进行脂肪酸甲酯化^[13], 所得样品采用 GC 测定。色谱柱为 SGE BPX70 毛细管柱 (100.0 m×250 μm×0.25 μm); 程序升温: 120 ℃ 保持 1 min, 3.5 ℃/min 升至 215 ℃, 保持 10min, 再以 5.0 ℃/min 升至 240 ℃, 保持 5 min; 进样口温度 240 ℃; 检测器温度 260 ℃; 氮气流速 1 mL/min; 分流比 10 : 1; 进样量 4 μL。

1.5.5 槐糖脂的分离纯化与结构鉴定

采用层析硅胶柱将 O-13-1 菌株以大豆油、煎炸废油为油溶性碳源发酵所产槐糖脂分别纯化后^[14], 应用 HPLC-MS/MS 进行槐糖脂同系物的分离鉴定, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLCBEH130 C18 (2.1 mm×150 mm×1.7 μm)。实验条件: 流动相 A: $V(\text{甲酸}) : V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 0.1 : 1.0 : 99.0$; 流动相 B: $V(\text{甲酸}) : V(\text{乙腈}) = 0.1 : 100.0$; 流速为 0.2 mL/min。等度洗脱条件为: 体积分数 80%B。柱温: 30 ℃, 进样量: 1 μL, UV 检测波长: 207 nm, 无分流进入质谱。质谱条件: 电喷雾正离子模式; 扫描范围 m/Z : 200~1000; 毛细管电压: 4.5 kV; 喷雾气压 10342.5 Pa; 干燥气 (N_2) 流速: 6 L/min; 气体温度: 80 ℃; 分辨率: 50000。

2 结果与讨论

2.1 油脂脂肪酸组分分析

比较普通大豆油和煎炸废油中脂肪酸组分的质量分数 (表 2) 可以看出, 煎炸前后油脂中脂肪酸组成基本一致, 主要包括, 十八碳二烯酸 (C18:2)、十八碳烯酸 (C18:1)、十六碳烷酸 (C16:0) 和十八碳烷酸 (C18:0) 4 种脂肪酸, 各脂肪酸质量分数依次降低; 相比较而言, 煎炸废油中多不饱和的 C18:2 脂肪酸含量明显低于未经煎炸的普通大豆油, 而饱和脂肪酸, 如, C16:0 和 C18:0 的含量相对升高。这主要是由于多不饱和脂肪酸在高温下发生氧化分解所致。Tyagi^[15]等指出, 多不饱和脂肪酸的分解程度与煎炸温度及煎炸时间密切相关, 在 190 ℃、10 h 的煎炸条件下, C18:2 脂肪酸质量分数从 52.3% 下降至 42.8%, 降幅为 18.16%。本文所用废油在煎炸时温度相对较低, 且煎炸时间较短, C18:2 脂肪酸含量降幅为 8.39%, 多不饱和脂肪酸氧化分解程度相对较轻。Felse^[16]等指出, C18 型脂肪酸最有利于产生槐糖脂。由表 2 可知, 本文所使用的煎炸废油中 C18 型脂肪酸所占质量分数高达 83.1%, 适宜作为

油溶性底物应用于槐糖脂生物表面活性剂的发酵合成。

表 2 油脂及槐糖脂中脂肪酸组分质量分数

Table 2 Relative content of fatty acid composition in oils and sophorolipids

脂肪酸类型	油脂中脂肪酸质量分数/%		槐糖脂中脂肪酸质量分数/%	
	大豆油	煎炸废油	大豆油	煎炸废油
C16:0	15.0	16.9	N.D.*	N.D.*
C18:0	5.1	5.9	15.7	10.5
C18:1	33.4	34.6	53.9	57.1
C18:2	46.5	42.6	20.7	32.4

注：* N.D.表示未检出。

2.2 O-13-1 菌株以煎炸废油为底物发酵制备槐糖脂的发酵动力学与条件优化

2.2.1 摇瓶培养的发醇动力学

葡萄糖和煎炸废油的初始质量浓度分别为 60 和 90 g/L，其中，煎炸废油在接种培养 24 h 后加入，定时取样监测菌体细胞生物量、槐糖脂产量，以及发酵液中残油、残糖和残氮的含量。O-13-1 菌株以葡萄糖和煎炸废油为碳源发酵生产槐糖脂的生长曲线如图 1 所示。由图 1 可知，在 204 h 的发酵时间内，菌体生物量的变化基本呈现“S”型曲线，

其中，0~8 h 增长缓慢，为延滞期，之后进入指数生长期，在 46 h 时达到最高值后进入稳定增长期。与菌体生物量相对应，发酵液中残糖和残氮的含量在指数增长期迅速降低。这是由于菌体细胞快速增长时会大量摄取葡萄糖和氮所致^[4]，之后分别维持在 3 和 0.1 g/L 左右。残氮量在 32 和 38 h 时已稳定在 0.1 g/L。依据文献^[4]，氮含量在达到稳定期后基本维持在低水平而无变化。所以，本文在稳定期后未再测定残氮量。槐糖脂在菌体生长进入稳定期后，即煎炸废油加入 8 h 后才开始快速大量的产生，与此同时，残油的含量迅速减小，在发酵结束即 204 h 时，槐糖脂产量最高，达到 57.64 g/L，此时发酵液中残油、葡萄糖的残留量分别为 4.32、3.39 g/L，利用率分别为 95.20%、94.35%。

2.2.2 摇瓶培养发酵条件的正交实验

表 3 为正交实验设计及结果。由表 3 可知，编号为 4 的槐糖脂产量最高，即摇床转速为 200 r/min、双碳源质量浓度均为 90 g/L、温度为 25 °C、接种量体积分数为 12%时，槐糖脂产量最高，达 73.26 g/L，是假丝酵母菌 ATCC 22214 以煎炸废油为油溶性碳源摇瓶发酵槐糖脂产量的 2.4 倍^[8]，与未优化前在发酵动力学中得到的槐糖脂产量 57.64 g/L 相比，提高了 27.10%。

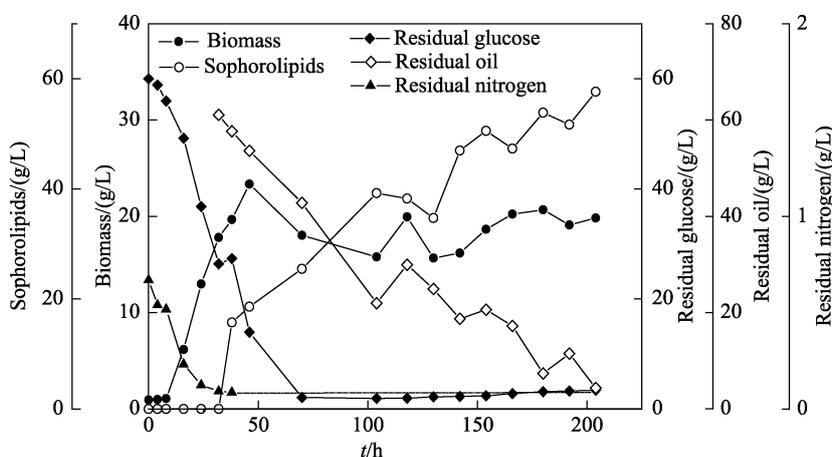


图 1 以煎炸废油为油溶性碳源发酵产槐糖脂的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of sophorolipid production with waste fried oil as lipid feedstock

正交实验极差分析结果如表 4 所示。通过因素各水平下的平均响应值，即 K 值大小确定最优组合为：摇床转速 200 r/min、温度 25 °C、碳源质量浓度 90 g/L、接种量为体积分数 12%，这与正交实验中产量最高的 4 号实验组的条件组合一致，因而未再做验证实验。比较 ΔK 确定对槐糖脂产量的影响因子由大到小排序依次为：摇床转速、双碳源质量浓度、培养温度和接种量，这与 Daverey^[9]等的研究结果基本一致。摇床转速是影响发酵过程氧交换速率和溶

解氧含量的重要因素^[17]，假丝酵母菌在合成槐糖脂过程的前期，即需要消耗氧来进行脂肪酸羟基化^[18]，因此，保证溶解氧水平是槐糖脂高产的基础。

2.3 槐糖脂结构鉴定

图 2 为 O-13-1 菌株以煎炸废油为油溶性底物在正交实验编号为 4 的发酵条件下所产槐糖脂同系物的 HPLC/ESI-TOF/MS 总离子流图，共分离出 9 种同系物。其中，保留时间为 4.294 min 处峰的丰度最高，质量分数为 31.7%，其质谱碎片见图 3。其中，

表 3 正交实验设计及结果
Table 3 Design and results of orthogonal test

编号	因素			接种量 体积 分数/%	槐糖脂 产量/ (g/L)
	摇床转速/ (r/min)	培养 温度/°C	双碳源质量 浓度/(g/L)		
1	160	25	60	4	9.23
2	160	30	90	8	26.72
3	160	35	120	12	17.84
4	200	25	90	12	73.26
5	200	30	120	4	35.82
6	200	35	60	8	25.48
7	240	25	120	8	36.12
8	240	30	60	12	23.40
9	240	35	90	4	31.80

表 4 正交实验极差分析表
Table 4 Range analysis of orthogonal test

	摇床转速/ (r/min)	培养温度/ °C	双碳源质量 浓度/ (g/L)	接种量 体积分数/%
K1	17.93	39.54	19.37	25.62
K2	44.85	28.65	43.93	29.44
K3	30.44	25.04	29.93	38.17
ΔK	26.92	14.50	24.56	8.73

注: K 代表因素各水平下的平均响应值, ΔK 代表因素水平对目标的效应极差^[10]。

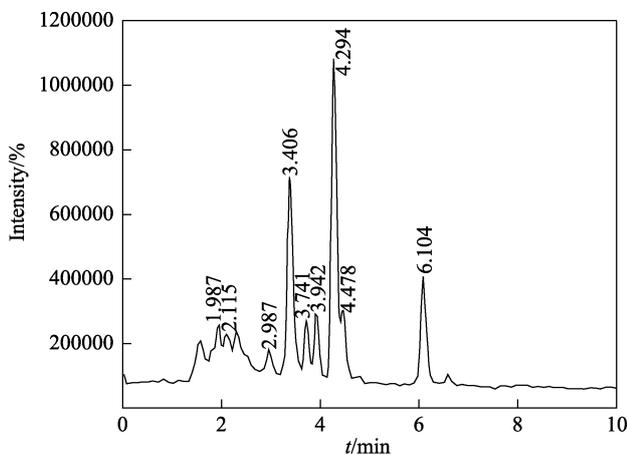


图 2 O-13-1 菌株以煎炸废油为碳源所产槐糖脂的 HPLC /ESI-TOF /MS 总离子流图

Fig. 2 Total ion liquid chromatogram of sophorolipids produced by O-13-1 strain with waste fried oil

质荷比 (m/Z) 为 689.38 的碎片为二乙酰基取代的内酯型槐糖脂的分子离子峰, $m/Z=711.36$ 为 $[M+Na^+]$ 峰, $m/Z=671.37$ 和 $m/Z=653.36$ 分别为 $[M+H^+]$ 失去 1 个水分子和 2 个水分子得到的, $m/Z=485.31$ 和 $m/Z=467.30$ 分别为 $[M+H^+]$ 失去一个己糖环和再失去 1 个水分子得到的。上述分析表明, 保留时间为 4.294 min 的组分为二乙酰基取代的内酯型槐糖脂, 即, 17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-1',4''-内酯-6',6''二乙酸酯。

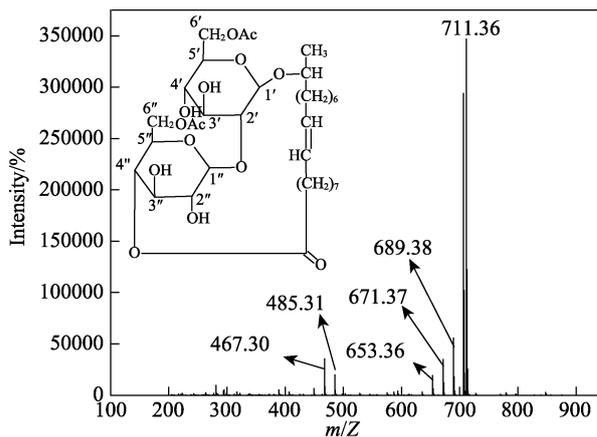


图 3 保留时间为 4.294 min 组分的质谱图

Fig. 3 Mass spectra of the component with a retention time of 4.294 min

O-13-1 菌株分别以煎炸废油、普通大豆油为油溶性碳源所产槐糖脂同系物的结构和质量分数如表 5 所示。由表 5 可以看出, 以煎炸废油为碳源发酵所产的槐糖脂含 9 种同系物, 较未煎炸的普通大豆油所合成的槐糖脂同系物多 2 种。以二者为碳源所合成的槐糖脂结构均为酸型或内酯型槐糖脂, 疏水基团为 C18:2、C18:1 或 C18:0 脂肪酸, 且以内酯型为主, 所占质量分数均达 70% 以上, 其中, 17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-1',4''-内酯-6',6''二乙酸酯质量分数最高, 分别为 31.7% 和 36.7%。

进一步分析以煎炸废油和普通大豆油为碳源所产槐糖脂中脂肪酸组成, 如表 2 所示。由表 2 可知, 以煎炸废油和普通大豆油为碳源所产槐糖脂中均以 C18:1 脂肪酸为主, 质量分数均在 50% 以上, 其次为 C18:2 脂肪酸, 质量分数分别为 32.4% 和 20.7%, 再次为 C18:0 脂肪酸, 质量分数分别为 10.5% 和 15.7%。值得注意的是, 槐糖脂中所含脂肪酸组成和含量排序与油脂中并不相同。一方面, 尽管油脂中含有相当量的 C16:0 脂肪酸, 但所合成的槐糖脂中并不含 C16:0 型结构; 另一方面, 油脂中 C18:2 脂肪酸占比明显高于槐糖脂中 C18:2 的占比。这主要是由于在槐糖脂合成过程中 C16:0 和 C18:2 型脂肪酸的 ω-羟基化程度远远高于 C18:0 和 C18:1 型脂肪酸^[4]。

2.4 发酵罐培养

进一步以正交实验所获得的优化发酵条件为基础, 应用 5 L 自动发酵罐培养, 通过控制转速和曝气量, 更精确地考察了溶解氧对 O-13-1 菌株以煎炸废油为油溶性碳源合成槐糖脂产量的影响, 发酵过程中发酵液的溶解氧含量随发酵时间的动态变化如图 4a 所示。由图 4a 可知, 不同转速下, 发酵液溶解氧均在菌体生长的指数增长期 (0~32 h) 快速下降, 特别是在分批补料的 16、40、64、88 h 时显著

表 5 O-13-1 菌株以煎炸废油和普通大豆油为底物发酵产槐糖脂同系物组分结构和质量分数

Table 5 Structure and mass fraction of the sophorolipid homologues produced by O-13-1 strain with soybean oil and waste fried oil as lipid substrates

糖脂名称	糖脂类型	m/Z	糖脂同系物质量分数/%	
			煎炸废油	大豆油
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-6',6"-二乙酸酯	酸型	707.3840	6.4	2.1
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八碳二烯酸-6',6"-二乙酸酯	酸型	705.3692	5.5	N.D.*
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6'-乙酸酯	内酯型	647.3629	4.5	2.4
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八碳二烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	687.3586	22.4	18.3
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-6"-乙酸酯	酸型	663.3584	5.5	7.2
18-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-6"-乙酸酯	酸型	663.3584	6.6	7.9
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	689.3743	31.7	36.7
18-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烯酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	689.3747	6.9	N.D.*
17-L-[(2'-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)-O]-十八烷酸-1',4"-内酯-6',6"-二乙酸酯	内酯型	691.3897	10.5	15.7

注：*N.D.表示未检出。

降低，之后逐渐升高，呈现锯齿状波折变化。这是由于补料时菌细胞会大量消耗溶解氧合成槐糖脂，同时油脂作为疏水性物质，也影响了发酵体系中溶解氧的传质系数。图 4b 是在 3 种转速条件下分别得到的槐糖脂产量，相对转速 400 r/min 的溶解氧变化和槐糖脂产量，转速 500 r/min 的溶解氧波动区间明显缩小，最低值仍在 60%，槐糖脂产量提高 14.68%，Guilmanov^[19]等指出，随着转速增加，氧交换速率提升，且较高水平的氧交换速率有利于槐糖脂的形成。相比之下，转速 600 r/min 的溶解氧变化与 500 r/min 类似，并没有明显提升溶解氧水平，这是由于，在 600 r/min 的发酵过程产生了大量的泡沫，过多的泡沫可能会导致氧传质系数降低和装液量与罐体总容量之比的装液系数下降^[20]，其槐糖脂产量相对其他两种转速最低。作为酵母细胞生长的限制因素^[1]，

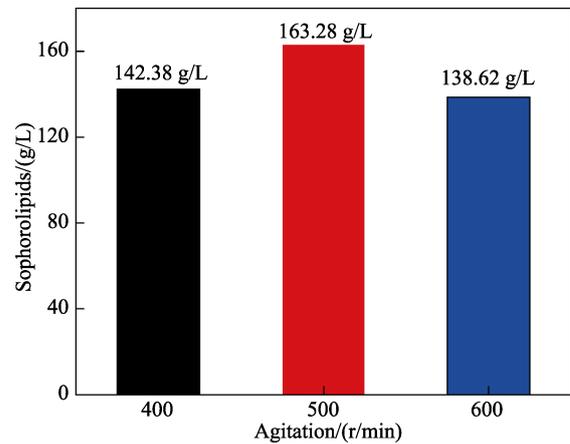


图 4b 不同转速下槐糖脂产量
Fig. 4b Yields of SLs in different speed of agitation

通过控制曝气量和转速，优化发酵过程中的溶解氧含量是后续的研究重点。

500 r/min 转速下发酵罐培养在发酵结束时的残糖、残油量分别为 3.36 g/L、10.27 g/L，葡萄糖和煎炸废油的转化率分别为 96.27%和 88.59%，槐糖脂产量达 163.28 g/L，较优化后的摇瓶培养，槐糖脂产量提高 1.2 倍。这一方面是由于，应用 5 L 自动发酵罐培养时，通过精确调控转速和曝气量可保证在发酵过程中溶解氧供给较为充足，从而有利于菌体细胞生长和槐糖脂合成；另一方面，通过分批补加油溶性底物，减少了油溶性底物对溶解氧传质速率的限制，提高了发酵系统中溶解氧的供给效率，有效提升了油溶性碳源的转化效率。在 5 L 自动发酵罐培养下，假丝酵母菌 O-13-1 以煎炸废油为油溶性碳源所获得的槐糖脂产量是假丝酵母菌 ATCC 22214 的 4.8 倍^[8]。产量显著提高不仅与制备槐糖脂的菌种和发酵条件有关，也与煎炸废油的理化性质，

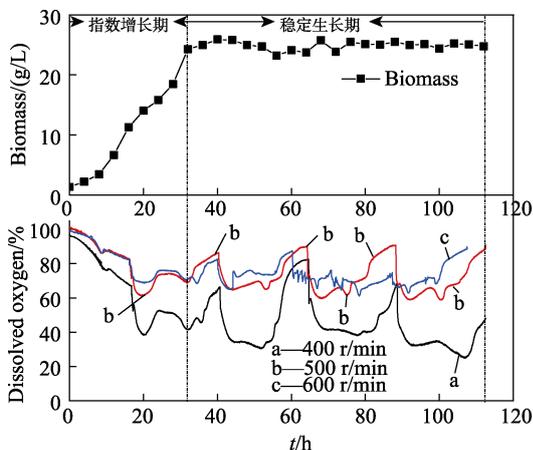


图 4a 不同转速下溶解氧的变化
Fig. 4a Change of dissolved oxygen in different speed of agitation

尤其是脂肪酸组成密切相关。就脂肪酸而言, 以 C18:1 脂肪酸为油溶性碳源所获得的槐糖脂产量最高^[1]。本文煎炸废油中的 C18:1 脂肪酸所占质量分数为 34.6%, 相对 Shah^[8]等所用废油中质量分数为 28.8%的 C18:1 脂肪酸, 占比提高了 20.14%。

本课题组以大豆油为底物发酵制备槐糖脂时, 在碳源添加量 120 g/L 的优化条件下, 5 L 自动发酵罐槐糖脂产量为 216.37 g/L, 大豆油转化率为 97.84%^[21]。相对本文所获得的 163.28 g/L 槐糖脂产量及 88.59%废油转化率, 如果获得单位质量的槐糖脂, 以煎炸废油为油溶性碳源的发酵培养基较以普通大豆油为碳源的发酵培养基成本更低。这表明, 应用煎炸废油为油溶性底物发酵槐糖脂, 不仅可以有效降低槐糖脂的生产成本, 而且可以实现煎炸废油的资源化和无害化处置, 具有良好的经济效益和环境效应。

3 结论

经正交实验优化后, 假丝酵母菌 O-13-1 发酵合成槐糖脂在摇床转速为 200 r/min, 煎炸废油质量浓度为 90 g/L, 温度为 25 °C, 接种量为体积分数 12% 的培养条件下, 摇瓶槐糖脂产量可达 73.26 g/L。该菌株以煎炸废油为油溶性碳源发酵合成槐糖脂同系物组成及结构与以未煎炸的大豆油为碳源时类似, 均由乙酰基取代的含有 L-羟基的内酯型和酸型槐糖脂同系物构成, 以内酯型槐糖脂为主, 槐糖脂结构中 C18:1 脂肪酸含量最高, 所占质量分数为 57.1%。在 5 L 自动发酵罐中转速 500 r/min 时溶解氧相对值在 60%~100%之间, 槐糖脂产量为 163.28 g/L。以煎炸废油为碳源发酵合成槐糖脂的原料成本较大豆油下降 18%, 可作为常规油溶性碳源的替代品, 在槐糖脂工业化规模发酵中具有重要应用价值。

参考文献:

- [1] Van Bogaert I N A, Saerens K, De Muynck C, *et al.* Microbial production and application of sophorolipids[J]. *Appl Microbiol Biot*, 2007, 76(1): 23-34.
- [2] Makkar R S, Cameotra S S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources[J]. *J Surfactants Deterg*, 1999, 2(2): 237-241.
- [3] Casas J A, Garcia-Ochoa F. Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods[J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 88(5): 488-494.
- [4] Davila A, Marchal R M, Vandecasteele J. Kinetics and balance of a fermentation free from product inhibition: sophorose lipid production by *Candida bombicola*[J]. *Appl Microbiol Biot*, 1992, 38(1): 6-11.
- [5] Maddikeri G L, Gogate P R, Pandit A B. Improved synthesis of sophorolipids from waste cooking oil using fed batch approach in the presence of ultrasound[J]. *Chem Eng J*, 2015, 263: 479-487.
- [6] Lam M K, Lee K T, Mohamed A R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review[J]. *Biotechnol Adv*, 2010, 28(4): 500-518.
- [7] Fleurackers S J J. On the use of waste frying oil in the synthesis of sophorolipids[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2006, 108(1): 5-12.
- [8] Shah V, Jurjevic M, Badia D. Utilization of restaurant waste oil as a precursor for sophorolipid production[J]. *Biotechnol Progr*, 2007, 23(2): 512-515.
- [9] Daverey A, Pakshirajan K. Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium[J]. *Appl Biochem Biotech*, 2010, 160(7): 2090-2101.
- [10] Liu Ruijiang (刘瑞江), Zhang Yewang (张业旺), Wen Chongwei (闻崇炜), *et al.* Study on the design and analysis methods of orthogonal experiment[J]. *Experimental Technology and Management (实验技术与管理)*, 2010, 27(9): 52-55.
- [11] Wang Junli (王俊丽), Nie Guoxing (聂国兴), Li Suzhen (李素贞), *et al.* Optimal wavelength for determining the content of reducing sugar by DNS method[J]. *J Henan Agri Sci (河南农业科学)*, 2010, (4): 115-118.
- [12] Ministry of Environmental Protection (环境保护部). National environmental protection standards of the People's Republic of China: HJ 636-2012[S]. Beijing: China Environmental Science Press (北京: 中国环境科学出版社), 2012:1-8.
- [13] Huang zheng (黄峥), Sheng Linghui (盛灵慧), Ma Kang (马康), *et al.* Efficiency of five methods for fatty acids methyl esterification[J]. *Chin Oils Fat (中国油脂)*, 2013, 38(9): 86-88.
- [14] Song Dandan (宋丹丹), Liang Shengkang (梁生康), Shang Yujun (尚玉俊), *et al.* Properties of sophorolipid produced by the yeast *Candida bombicola* grown on different lipophilic carbon substrates [J]. *Environ Chem (环境化学)*, 2015, 34(7): 1252-1258.
- [15] Tyagi V K, Vasishtha A K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1996, 73(4): 499-506.
- [16] Felse P A, Shah V, Chan J, *et al.* Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues[J]. *Enzyme Microb Tech*, 2007, 40(2): 316-323.
- [17] Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos V E, *et al.* Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview[J]. *Biochem Eng J*, 2010, 49(3): 289-307.
- [18] Van Bogaert I N A, Zhang J, Soetaert W. Microbial synthesis of sophorolipids[J]. *Process Biochem*, 2011, 46(4): 821-833.
- [19] Guilmanov V, Ballistreri A, Impallomeni G, *et al.* Oxygen transfer rate and sophorose lipid production by *Candida bombicola*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(5): 489-494.
- [20] Zhang Dongmei (章冬梅). Effect and control of foam on industrial fermentation[J]. *Chemical Engineering Design (化工设计)*, 2008, 18(1): 17-20.
- [21] Zhai Qiuqian (翟秋倩). The construction of sophorolipid biosurfactants bacterial strain with high yield and the optimization of high efficient fermentation process[D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology (青岛: 青岛科技大学), 2017.