

研究报告

色醇对斯达氏油脂酵母产油能力的影响

武 双¹ 华艳艳² 仲崇斌¹ 赵宗保^{2*}

(1. 东北大学理学院生物技术研究所 沈阳 110004)

(2. 中科院大连化学物理研究所生物技术部 大连 116023)

摘 要: 研究在发酵培养基中添加色醇对斯达氏油脂酵母发酵的影响。结果表明, 在接种后 0 h 或 12 h 时添加色醇, 能够明显抑制菌体生长和油脂积累; 而在培养 24 h 或 36 h 添加, 能够明显促进菌体生长, 并增强菌体对底物利用率。与对照组比较, 在 36 h 添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 色醇, 生物量、油脂量和脂肪系数分别增加 7.4%、13.9% 和 14.2%, 发酵时间缩短 13.3%, 明显提高了油脂生产效率。气相色谱分析表明, 添加色醇对菌油脂脂肪酸组成及其相对含量无显著影响。实验结果有助于建立调控油脂发酵的新策略, 具有重要的理论和工程应用意义。

关键词: 斯达氏油脂酵母, 微生物油脂, 色醇, 发酵

The Effect of Tryptophol on Lipid Fermentation by *Lipomyces starkeyi*

WU Shuang¹ HUA Yan-Yan² ZHONG Chong-Bin¹ ZHAO Zong-Bao^{2*}

(1. Institute of Biological Technology, Northeastern University, Shenyang 110004)

(2. Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116023)

Abstract: In this study, we have investigated the effect of tryptophol (TrpOH) on lipid fermentation by *Lipomyces starkeyi*. The results showed that cell growth and lipid accumulation were significantly inhibited when TrpOH was introduced at 0 h or 12 h; while substantial positive effects were observed when TrpOH was applied at 24 h or 36 h after inoculation. Specifically, biomass, lipid and lipid coefficient increased by 7.4%, 13.9% and 14.2% respectively, but fermentation time decreased by 13.3%, when 100 $\mu\text{mol/L}$ TrpOH was introduced at 36 h. However, little effects were found on the fatty acid constitutional profile of the microbial lipid produced in the presence of TrpOH. These results are valuable to develop more economical lipid fermentation technology.

Keywords: *Lipomyces starkeyi*, Microbial oil, Tryptophol, Fermentation

微生物油脂, 又称单细胞油脂, 是指某些微生物包括酵母菌、霉菌和藻类等在内过量贮存的脂肪酸甘油酯。某些菌属能够将碳水化合物或碳氢化

合物等转化为占细胞干重 70% 以上的油脂^[1]。大部分微生物油脂的脂肪酸组成与植物油脂相似, 主要是 C_{16} 、 C_{18} 系脂肪酸, 如棕榈酸、棕榈油酸、硬脂

酸、油酸及少量多不饱和脂肪酸等。微生物油脂用途广泛, 通过与醇反应, 可生产润滑油、溶剂油、油漆、表面活性剂和粘接剂等产品^[2], 同时还可作为获取高附加值脂肪酸^[3], 如 γ -亚麻酸(GLA)^[4]、花生四烯酸(ARA)^[5]、二十碳五烯酸(EPA)^[6]、二十二碳六烯酸(DHA)^[7]等的原料。因此, 微生物油脂研究具有广阔发展空间。

目前, 生物柴油的生产主要以动、植物油脂为原料。由于动植物油脂资源总量非常有限, 限制了生物柴油产业可持续发展。传统植物油脂生产和农业生产伴生大量废弃生物质资源, 如农作物秸秆等, 它们所蕴藏的能量远远超过相应的植物油脂所蕴藏的能量。生物质经水解得到碳水化合物, 可作为发酵原料生产微生物油脂。因此, 利用微生物发酵法获取油脂发展潜力巨大, 可望为生物柴油生产提供稳定的原料^[8]。此方法为废弃生物质利用提供新途径, 有利于环境保护, 而且对降低油脂生产成本, 实现油脂连续供给, 缓解我国油脂资源短缺局面具有重要意义。

色醇是真核微生物进行多细胞间互相联系的信息分子^[9]。通过释放与接受信号分子, 微生物群体可同步、协调地应对环境变换, 并调控细胞内代谢流分布^[10]。关于真核细胞信号分子的研究尚处于理论研究初期, 至今未见应用于调节微生物代谢, 提高获取发酵工程产品效率的报道。

本文探索在发酵期间添加色醇对产油酵母生长、代谢特征和油脂积累的变化规律, 目的是为了建立宏观调控油脂积累代谢策略, 增强微生物将碳水化合物转化为油脂的能力, 缩短发酵周期, 提高微生物油脂发酵过程技术经济性。

1 材料与方法

1.1 菌种及试剂

产油酵母 *Lipomyces starkeyi* 2#菌, 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。色醇(tryptophol, CAS: 526-55-6, 化学名为 3-羟乙基吲哚, TrpOH)购自 Sigma 公司, 溶解于二甲基亚砷(DMSO)中, 配制成溶液, 备用。酵母粉、蛋白胨和琼脂粉购自北京奥博星生物技术责任有限公司, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 培养基

液体种子培养基组成: 葡萄糖 20 g/L, 酵母粉

10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, pH 5.8~6.0; 固体培养基在此基础上加入琼脂粉 20 g/L。

发酵培养基组成: 葡萄糖 70 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, pH 5.8~6.0。以上培养基均在 1×10^5 Pa 蒸汽灭菌 15 min。

1.3 培养条件

将新鲜斜面菌种接入 50 mL 液体种子培养基中, 于 30 、200 r/min 振荡培养 20~24 h。以 10 %接种量接种于 45 mL 发酵培养基中, 分别在不同时间添加色醇溶液, 在相同条件下振荡培养, 定期取样测定发酵液中残糖, 待其降至 1 g/L 以下时结束发酵, 测定发酵液中残氮、菌体生物量和油脂产量。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体生物量测定: 湿菌体于 105 烘至恒重, 以 g 干菌体/L 发酵液表示菌体生物量。

1.4.2 油脂提取: 参照文献方法直接进行油脂抽提^[11], 油脂含量为菌体油脂量占菌体生物量的百分数。

1.4.3 残糖测定: 采用山东省科学院生产的 SBA-50B 生物传感分析仪进行葡萄糖含量的测定, 检测范围在 0 g/L~1.0 g/L。

1.4.4 残氮测定: 凯氏定氮法^[12]。

1.4.5 油脂组成分析^[13]: 待测样品甲酯化参照文献方法^[14]。样品分析采用上海天美分析仪器有限公司生产的 GC7890 气相色谱仪, 浙江大学 N2000 色谱工作站, 脂肪酸通过对照标准样品定性, 用面积归一法确定相对含量。色谱柱: FFAP 石英毛细管柱 (30 m \times 0.32 mm \times 0.4 μm); 柱温 190 ; 进样器温度 250 ; 进样量 0.2 μL ; 载气 N_2 41 mL/min, 检测器(FID)温度 280 ; H_2 33 mL/min, 空气 100 mL/min, 分流进样。

1.4.6 统计学处理: 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 色醇浓度对 *L. starkeyi* 2#产油能力的影响

在接种后 24 h 添加色醇溶液, 其浓度范围为 10 $\mu\text{mol/L}$ ~5000 $\mu\text{mol/L}$, 添加体积均为 250 μL , 培养至发酵终点, 离心收集菌体, 经干燥后消化, 提取油脂。计算菌体生物量, 油脂量及脂肪系数。实验结果见图 1。

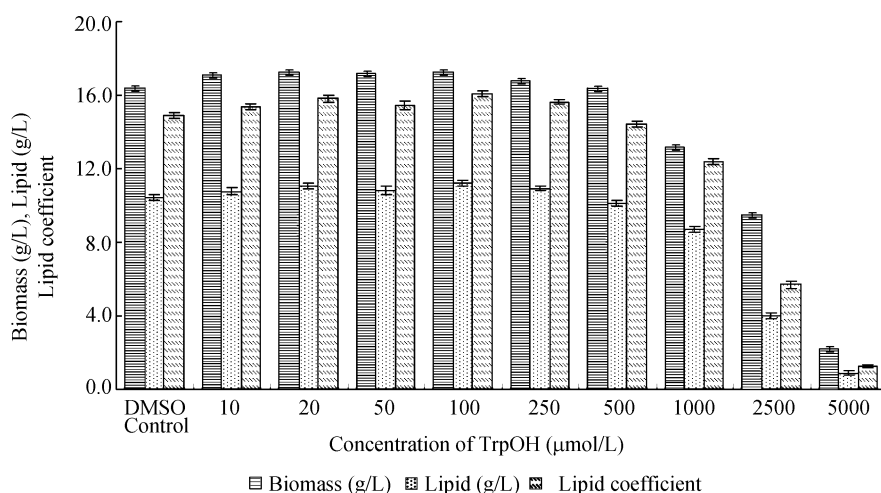


图 1 色醇浓度对 *L. starkeyi* 2#菌油脂发酵的影响

Fig. 1 The effect of concentration of TrpOH on lipid fermentation by *L. starkeyi* 2#

由图 1 可知, *L. starkeyi* 2#菌生物量、油脂量和脂肪系数随色醇浓度增加先增大后减少 ($P<0.05$)。色醇添加浓度 10 $\mu\text{mol/L}$ ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 生物量、油脂量和脂肪系数比对照组略高; 100 $\mu\text{mol/L}$ ~ 5000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随着色醇浓度的增加菌体生长和油脂积累受到明显抑制, 且添加浓度越高, 抑制作用越明显。当添加浓度为 5 mmol/L 时, 培养基中葡萄糖浓度消耗至 33 g/L 时趋于稳定, 生物量和油脂量仅有 2.2 g/L 和 0.9 g/L, 说明色醇对该菌产生了毒性作用。因此, 色醇添加浓度以 100 $\mu\text{mol/L}$ 为宜, 当浓度大于 1 mmol/L 时, 会产生明显抑菌效应。

2.2 不同培养时间添加色醇对 *L. starkeyi* 2#产油能力的影响

分别在接种后 0 h、12 h、24 h 或 36 h 时添加色醇溶液至终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, 培养至发酵终点, 离心收集菌体, 提取油脂。实验结果见图 2。

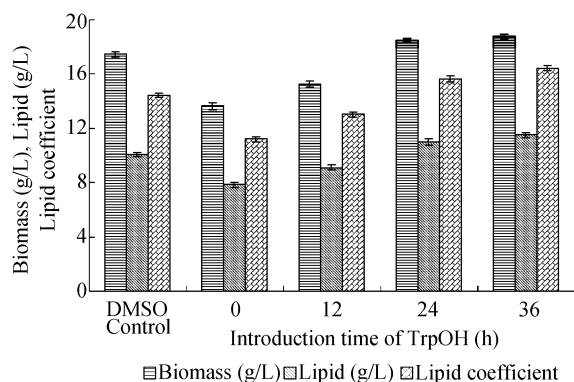


图 2 不同时间添加色醇对 *L. starkeyi* 2#菌油脂发酵的影响

Fig. 2 The effect of TrpOH on lipid fermentation by *L. starkeyi* 2#

由图 2 结果可以看出, 在菌体生长延滞期, 即接种后 0 h 或 12 h 时添加色醇, *L. starkeyi* 2#菌生长受到抑制, 生物量、油脂量和脂肪系数比对照组低 ($P<0.05$), 并且添加时间越早抑制作用越明显。在接种时添加, 可使生物量、油脂量及脂肪系数分别降低 22.0%, 22.4%和 22.2%; 而在对数生长期, 即接种后 24 h 或 36 h 时添加色醇则对油脂发酵有促进作用, 生物量、油脂量和脂肪系数均高于对照组 ($P<0.05$), 在 36 h 添加, 可使生物量和油脂量分别增加 7.4%和 13.9%。脂肪系数是指每 100 g 底物经发酵转化所获得的脂肪质量, 它是评价产油微生物生产性能的重要指标之一。在 36 h 添加可使脂肪系数增幅达到 14.2%, 明显提高了底物转化能力。

图 3 列出了色醇存在下 *L. starkeyi* 2#菌利用葡萄糖发酵的底物变化曲线。在 0 h 或 12 h 添加色醇, 细胞生长、繁殖和代谢速率减缓, 菌体对底物利用能力降低。

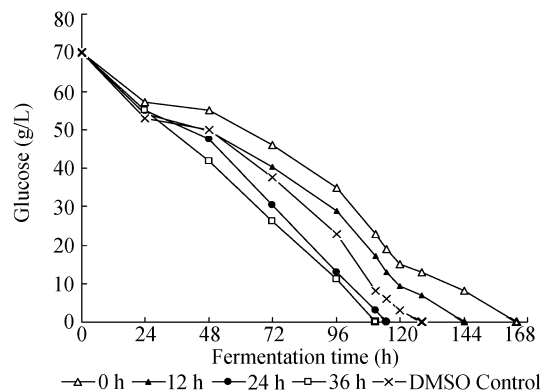


图 3 添加色醇对 *L. starkeyi* 2#底物消耗的影响

Fig. 3 Glucose consumption curve of *L. starkeyi* 2# in the presence of TrpOH

与对照组比较, 发酵初始时添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 色醇使发酵时间延长 36 h; 而在对数生长期外添加色醇, 可以促进代谢过程, 菌体生长和油脂积累速度加快, 碳水化合物利用率提高。与对照组比较, 在接种后

36 h 添加色醇可使发酵时间缩短 13.3%。

2.3 油脂脂肪酸成分分析

利用气相色谱仪分析了添加色醇条件下 *L. starkeyi* 2#菌所产菌油的脂肪酸组成, 结果见表 1。

表 1 添加色醇对 *L. starkeyi* 所产菌油脂脂肪酸组成的影响*

Table 1 Fatty acids analysis of microbial oil produced by *L. starkeyi* 2# in the presence of TrpOH

Entry	Induction time	Distribution of fatty acids (%)						
		Myristic acid	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Unknown
1	Control	0.5	36.6	3.8	7.6	45.5	0.5	5.5
2	0 h	0.4	34.0	3.4	6.0	52.0	0.6	3.6
3	12 h	0.4	33.8	5.3	6.0	51.5	0.4	2.6
4	24 h	0.4	35.1	3.3	7.2	49.6	0.5	3.9
5	36 h	0.4	34.8	3.3	7.9	50.2	0.6	2.8

* 相对含量低于 0.1% 的脂肪酸未列出。

* Fatty acids listed herein were those with their relative contents higher than 0.1%.

由上表数据可知, *L. starkeyi* 2#菌所产油脂主要由 C_{16} 和 C_{18} 系脂肪酸组成, 与常规植物油脂相似。和对照组相比, 添加色醇导致油酸含量略有增加, 增幅小于 15.0%; 棕榈酸含量略有减少, 降幅小于 8.0%; 其它脂肪酸相对含量基本没有变化。以上结果说明, 添加色醇未显著改变菌油的脂肪酸成份及其相对含量, 说明这种小分子没有直接作用于脂肪酸合成途径。

3 结论

本实验首次研究了添加信号分子色醇对 *L. starkeyi* 2#菌油脂发酵过程的影响。在接种后菌株对数生长期添加色醇可明显提高菌体生长和底物转化为油脂的效率, 缩短发酵时间, 提高油脂生产强度, 该发现有助于建立调控油脂发酵的新策略, 不仅具有重要的学术价值, 而且对改善微生物油脂发酵过程技术经济性具有指导意义。目前科研人员正在研究色醇等信号分子对产油酵母代谢调控的分子机制和工程化应用。

参 考 文 献

- [1] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, **51**: 1–51.
- [2] 曾益坤, 张根旺. 我国油脂化工、精细化工生产现状与发展建议. *中国油脂*, 2005, **30** (5): 5–10.
- [3] Certik M, Shimizu S. Biosynthesis and regulation of mi-

crobial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**: 1–14.

- [4] Somashekar D, Venkateshwaran G, Sambaiah K, *et al.* Effect of culture conditions on lipid and gamma-linolenic acid production by mucoraceous fungi. *Process Biochem*, 2003, **38** (12): 1719–1724.
- [5] 朱法科, 林伟铁, 鲍时翔, 等. 花生四烯酸高产菌株的选育. *工业微生物*, 1999, **29** (2): 1–3.
- [6] Bajpai P, Bajpai PK. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms. *J Biotechnol*, 1991, **31**: 267–272.
- [7] Singh A, Ward OP. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Adv Appl Microbiol*, 1997, **45**: 271–312.
- [8] 赵宗保. 加快微生物油脂研究为生物柴油产业提供廉价原料. *中国生物工程杂志*, 2005, **25** (2): 8–11
- [9] Sprague GF, Winans SC. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev*, 2006, **20** (9): 1045–1049.
- [10] Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev*, 2006, **20** (9): 1150–1161.
- [11] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *J Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911–917.
- [12] 黄伟坤. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, pp. 53–54.
- [13] 张 峻, 邢来君, 王红梅. -亚麻酸高产菌株的选育及发酵产物的分离提取. *微生物学通报*, 1993, **20** (3): 140–143.
- [14] Li Y, Zhao Z, Bai F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **41** (3): 312–317.