

高产油脂酵母菌选育及摇瓶发酵条件的研究

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: 经紫外线和 EMS 复合诱变选育出一株高产油脂的优良酵母菌株, 命名为 *Lipomyces starkeyi* HL。通过摇瓶培养, 对各项与菌体产油脂相关的因素作了单因子实验, 确定了摇瓶发酵培养的最佳产油脂条件: 碳源, 废糖液 165.7ml/L; 氮源, 硫酸铵 1.08g/L; C/N: 61:1; 培养温度为 28℃; 接种量 10%; 发酵时间 96h; pH5.0; 最后可得油脂产量 5.9g/L; 菌体生物量 11.0g/L; 油脂含量 53.6%。对菌体内油脂组成进行了气相色谱与质谱分析, 结果如下: 软脂酸 33.2%, 棕榈油酸 3.4%, 硬脂酸 6.0%, 油酸 50.8%, 亚油酸 3.55%, 亚麻酸 1.53%, 其它 1.52%。

关键词: 酵母菌 *L. starkeyi* HL, 废糖液, 发酵条件, 油脂含量及组成

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0093-05

SCREENING OF THE HIGH LIPID PRODUCTION STRAINS AND STUDIES ON ITS FLASK CULTURE CONDITIONS

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: A mutant of *Lipomyces starkeyi* was obtained through multiple mutagenesis (Ultraviolet and EMS) and named as *L. starkeyi* HL, which has the capability of accumulating substantial amount of lipid under N-limited culture conditions. Then several factors influencing the lipid accumulation were investigated and the optimum conditions of producing lipid were obtained: concentrations of waste sugar and the nitrogen source (NH₄)₂SO₄ were 165.7ml/L and 1.08g/L; C/N 61:1; initial pH5.0; inoculation volume 10%; temperature 28℃; culture time 96h. This research analyzed the lipid from the mutant *L. starkeyi* HL with MS/GC, it's content fatty acid were palmitic acid 33.2%, palmitoleic acid 3.4, steric acid 6.0%, oleic acid 50.8%, linoleic acid 3.55%, linolenic acid 1.53%, others 1.52%.

Key words: *L. starkeyi* HL, Waste sugar, Fermentation conditions, Lipid component and contents

当前, 国内外工业用油和食用油脂的主要来源均以动、植物油脂为主, 而动、植物油脂的供应有限。又由于石油的开采和贮量有限, 工业用油势必走向多种渠道开发的途径。利用微生物生产油脂可开发新的油脂资源, 但是由于微生物油脂(即: SCO)生产成本较高, 为降低生

产成本, 便于实现规模化工业生产, 有必要把 SCO 生产转向利用一些农副产品和工业废物为原料进行研制。本实验所采用的废糖液是一种价格较低廉的碳源, 它主要含 18.1% 的还原糖

作主要碳源,这样不仅降低了生产的成本,实现了资源的循环再利用,更重要的是为解决人类面临的油脂危机提供了一条新的开发途径。另外对这些存在于SCO中的不饱和脂肪酸($C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 、 $C_{20:3}$ 、 $C_{20:4}$ 、EPA、DHA)的研究也具有深远的意义^[1],这些存在于SCO中的不饱和脂肪酸对人体保健和疾病的预防有特殊疗效,被公认为是高附加值的白色农业产品。

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(*Lipomyces 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, pH6.0, 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, $(NH_4)_2SO_4$ 2.5g, 酵母膏 1g, KH_2PO_4 7g, Na_2HPO_4 2g, $MgSO_4$ 2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1g, $(Na)_2Mo_2O_7$ 10mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 10mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5mg, 定容至 1L。氮源-限制性发酵培养基:葡萄糖 25g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, 无酵母膏, 其它成分同液体种子培养基。废糖液发酵培养基:废糖液 138mL, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, KH_2PO_4 7g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 85mg, Na_2HPO_4 2g, $MgSO_4$ 2g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 9.3mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 10mg, $(Na)_2Mo_2O_7$ 10mg, 定容至 1L。

1.2 工作条件

色谱:色谱柱:PEG-20M石英弹性毛细管柱(柱长 30m, 柱直径 $d = 0.25mm$)。

汽化温度:230℃ ~ 280℃, 3℃ / min; 柱前压:0.5kg/cm²;分流比:10:1。

质谱:准直杆温度:200℃;分辨率:500;分离器温度:250℃;加速电压:3kV。

1.3 分析方法

1.3.1 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 2 次, 85℃ 烘干至

恒重, 称量干菌体。比色法:将发酵结束的培养液适当稀释, 在 570nm 处测光密度值。

1.3.2 残糖和残氮测定:分别用 Somogyi 法^[3]和靛酚蓝比色法^[4]。

1.3.3 油脂含量测定:用 Soxhlet 和 Folch 提取法^[5,6]。

1.3.4 菌体中脂肪滴观察:苏丹黑染色法^[7]。

1.3.5 油脂组成成分分析:SP-3700 型色谱仪, Finnigan Mat212 型磁质谱仪。

菌体油脂加 5% KOH-甲醇溶液封管水解 → 14% BF_3 -甲醇溶液封管甲酯化 → 加饱和 NaCl 溶液分层 → 以石油醚 (bp30~60) 提取 → 无水 Na_2SO_4 干燥 → 挥发溶剂 → 进样测定。

1.3.6 废糖液中无机离子分析:岛津 RIA 气相色谱仪: Finnigan Mat 212 型磁质谱仪。

1.4 菌株的诱变选育

采用紫外线和 EMS 复合诱变方法^[7]。筛选优良菌株所用指标为:把各单菌落接一环菌于氮源-限制性发酵培养基中, 30℃、140r/min 摇床培养 72h。后对菌体进行苏丹黑染色, 显微镜观察, 挑选菌体细胞内脂肪滴多、大的菌株再置于氮-限制性发酵培养基中, 发酵培养, 最后用 Soxhlet 提取法测其油脂含量, 得到油脂含量高的优良菌株。

1.5 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。

1.6 摇瓶发酵条件优化培养

液体种子按 10% 的接种量接于氮源-限制性发酵培养基中, 140r/min 摇床培养。分别从金属离子的有无、不同培养温度、不同氮源、不同 C/N、不同废糖液加入量等几个方面进行了研究。发酵过程定时回调 pH 为 5.0, 发酵结束测定最后的菌体生物量 (g/L)、油脂产量 (g/L)、油脂得率 $Y_{L/S}$ 、葡萄糖的消耗速率 (g/L/h)。

2 结果与讨论

2.1 菌株的复合诱变选育

经紫外线与 EMS 诱变后, 得到了一株菌体细胞内含脂肪颗粒较多、较大的良好菌株, 编号

为 *L. starkeyi* HL。把这一菌株和原始菌株 (Y_0)、第1次经紫外线诱变得到的较好的菌株 (Y_1) 分别接入氮源-限制性发酵培养基中进行发酵后,其性状比较如下(见表1)。

表1 *L. starkeyi* HL与 Y_0 、 Y_1 菌株的性状比较

菌株号	菌体生物量 (g/L)	油脂产量 (g/L)	油脂含量 (w)
Y_0	9.5	3.05	32.1
Y_1	10.2	4.15	40.7
<i>L. starkeyi</i> HL	10.4	4.64	44.6

由表1可以看出:经EMS和紫外线诱变得到的突变株 *L. starkeyi* HL,其油脂含量比 Y_0 增高了39%,与之相比,菌体生物量增加较少。

2.2 菌株摇瓶发酵培养条件的研究

2.2.1 金属离子对菌体生长和产油脂的影响:

分别见图1和图2。考虑到在以后实验中所用的主要碳源是废糖液,而废糖液中各种金属离子的有无及含量各不相同,所以对各金属离子的影响作了研究。(从氮源-限制性发酵培养基中分别去掉其中的 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 各1种)。

由图1和图2可以看出,培养基中缺乏 Mg^{2+} 菌体几乎不生长,相应的菌体生物量和油脂产量也会很低,可见 Mg^{2+} 为菌体生长所必须含有的离子;培养基中 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mo^{2+} 的缺乏不利于菌体的生长和油脂的积累,所以要适量加入;培养基中 Fe^{3+} 的缺乏对菌体生长和油脂含量几乎没有影响; Zn^{2+} 缺乏虽然对菌生长稍有影响,但它的缺失却有利于菌体

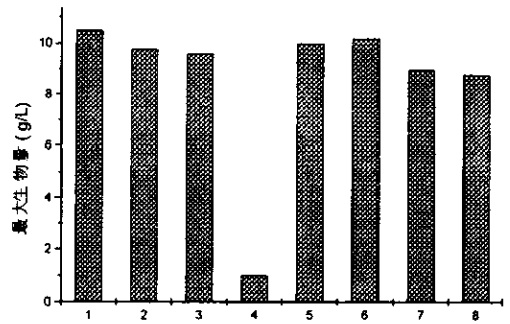


图1 金属离子的缺失对菌体生物量的影响

1对照,2缺 Mn^{2+} ,3缺 Cu^{2+} ,4缺 Mg^{2+} ,5缺 Zn^{2+} ,
6缺 Fe^{3+} ,7缺 Mo^{2+} ,8缺 Co^{2+}
■ 最大生物量(g/L)

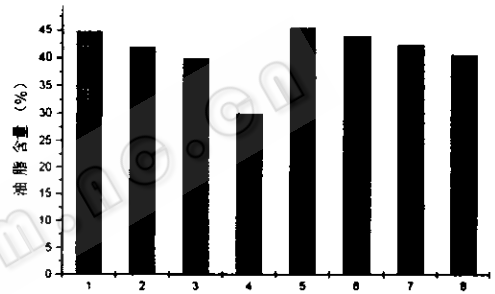


图2 金属离子的缺失对菌体油脂含量的影响

1对照,2缺 Mn^{2+} ,3缺 Cu^{2+} ,4缺 Mg^{2+} ,5缺 Zn^{2+} ,
6缺 Fe^{3+} ,7缺 Mo^{2+} ,8缺 Co^{2+}
■ 油脂含量(%)

内油脂的积累,所以培养基中应为限量。据此研究结果,对以下实验所使用的废糖液培养基成分进行适度地调整,使它更有利于菌体生长和油脂的积累。

2.2.2 葡萄糖与废糖液对菌体产油脂的比较:

表2 葡萄糖与废糖液对产油脂的比较

碳源	初始还原糖 浓度(g/L)	发酵周期 (h)	菌体生物量 (g/L)	脂百分含量 (w)	油脂产量 (g/L)	油脂得率 $Y_{L/S}$
葡萄糖	25	72	10.4	44.6	4.64	0.185
废糖液	25	84	10.3	43.2	4.45	0.178

(见表2)。

由表2可知,废糖液除使发酵周期有所延长外,其发酵结束时菌体生物量和油脂积累情况比以葡萄糖为碳源时相差不多。且从经济上考虑,废糖液不仅价格低廉,而且在其中还含有少量的可供菌体生长、积累脂类所需要的金属

离子和其它营养元素。相比之下,以废糖液代替葡萄糖生产油脂不仅是可行的,而且还比单纯使用葡萄糖更为经济一些。

2.2.3 不同的氮源对菌体生长和产油脂的影响:

采用不同的氮源如: NH_4Cl 、 $NaNO_3$ 、尿素、酵母膏、蛋白胨代替废糖液培养基中的 $(NH_4)_2SO_4$,

各种不同无机氮源的加入量分别为0.015mol/L (相当于1g/L的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 而其它几种有机氮源的加入量为0.1%。

实验结果表明, 菌体以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 为氮源所得的油脂产量分别为4.45g/L、4.39g/L, 油脂百分含量分别为43.2%、41.8%。而以酵母膏、蛋白胨为氮源所得的油脂产量大约为3.36g/L, 相应的油脂百分含量约为29%。以尿素、 NaNO_3

为氮源所得的油脂产量和油脂百分含量居中。但相比较之下, 菌体以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4Cl 为氮源所得的油脂产量、油脂百分含量都比以酵母膏、蛋白胨为氮源所得的要高, 这说明 *L. starkeyi* HL 能更好地利用无机氮源进行油脂的积累。所以在以后的实验中选用无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 NH_4Cl 作为发酵所用的理想氮源。

2.2.4 不同培养温度对菌体生长和产油脂的影响

表3 不同培养温度对菌体产油脂的影响

温度 ($^{\circ}\text{C}$)	培养时间 (h)	油脂百分含量 (w)	油脂产量 (g/L)	油脂得率 $Y_{L/S}$	葡萄糖消耗速率 (g/L·h)	残糖 (g/L)
20	96	-	-	-	-	-
24	96	34.1	2.22	0.126	0.169	8.7
28	84	45.3	4.85	0.204	0.282	1.3
32	84	43.0	4.37	0.196	0.265	2.7

响: 分别见图3和表3。

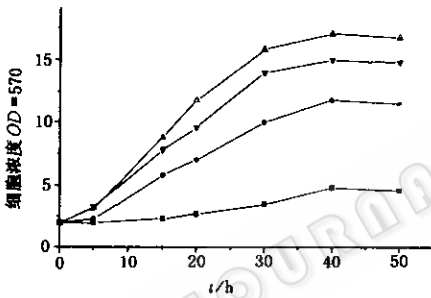


图3 不同的培养温度对菌体生长的影响

—■— 20度, —▲— 28度, —●— 24度, —▼— 32度

由图3和表3可以看出菌体在28 $^{\circ}\text{C}$ 时生长最快, 且油脂的百分含量、油脂产量及葡萄糖的消耗速率都比24 $^{\circ}\text{C}$ 、32 $^{\circ}\text{C}$ 高, 但最后发酵液中的残糖却比24 $^{\circ}\text{C}$ 、32 $^{\circ}\text{C}$ 时低。这说明在此温度下, 葡萄糖既可被菌体迅速吸收又可较充分地转化成胞内脂类, 所以选择28 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳培养温度。

2.2.5 不同的C/N比对菌体生长和产油脂的影响: 据很多研究报道, 一般能在体内积累大量的脂类酵母菌都会受到培养基中C/N的影响。但是, 不同的菌株最适合其积累油脂的C/N会随菌株的不同而有所不同, 所以研究了不同的C/N比对菌株产油脂的影响。以废糖液发酵培养基为基本培养基, 其中的碳源浓度不

变, 改变培养基中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度, 以调节C/N(摩尔比)。

实验结果表明, 培养基中C/N比从42.3:1~110:1的改变并不能使油脂产量也成比例增加。这是因为随着C/N比的增加, 虽然菌体的油脂含量会不断增加, 但菌体生物量会随之减少, 培养基中的残糖量也会不断增加, 所以并非C/N比越高越好。最佳C/N应使菌体的油脂产量和油脂得率较高, 同时发酵结束时残糖要低。经实验可知, 当培养基中的C/N=61:1时, 油脂产量和油脂得率最高, 分别为5.02g/L和0.216, 所以C/N=61:1被选为最佳C/N比。

2.2.6 相同C/N但含不同的废糖液和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量对菌体产油脂的影响: 固定培养基中的C/N=61:1, 相应地改变培养基中的废糖液和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 量。实验结果表明, 在相同的C/N比情况下, 并非废糖液的加入量越多越好。因为废糖液加入量过多, 致使最后发酵液中的残糖量会增加, 造成原料的浪费。当C/N=61:1, 废糖液和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 加入量分别为165.7mL和1.08g/L时, 油脂产量、油脂百分含量及葡萄糖的消耗速率较高, 分别为5.90g/L、53.6%和0.279g/L/h, 而最后的残糖量略高。实验结果比较理想, 所以在以后进行小型发酵罐实验时, 可以选择此加入量。

2.2.7 菌体油脂的主要组成成分及含量

油脂成分分析结果表明, *L. starkeyi* HL 菌体不饱和脂肪酸含量较高, 脂酰基所携带的大都为二十碳以下的脂肪酸, 所以它的流动比较大。其中软脂酸和油酸含量占油脂成分的大部分, 分别为 33.2% 和 50.8%, $C_{16:1}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:3}$ 及其它脂肪酸含量分别为 3.4%、6.0%、3.55%、1.53% 和 1.52%。

由以上摇瓶培养优化结果得出: 对 *L. starkeyi* HL 而言, 最适培养温度为 28℃; 最佳氮源为 $(NH_4)_2SO_4$ 、 NH_4Cl ; 发酵时间 96h; 培养基中废糖液加入量为 165.7ml/L, $(NH_4)_2SO_4$ 加入量为 1.08g/L; 最佳 C/N = 61:1; 所得的最高菌体生物量、油脂产量和油脂百分含量分别为 11.0g/L、5.90g/L 和 53.6%。菌体油脂成分分析结果表明, *L. starkeyi* HL 菌体不饱和脂肪酸含

量较高。

参 考 文 献

- [1] 张峻, 邢来君, 王红梅. 微生物学通报, 1993, 20(3): 140~142.
- [2] Hiroaki Y. Journal of Fermentation and Technology, 1983, 61(9): 275.
- [3] 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.
- [4] 马钦. 元素分光光度法. 北京: 地质出版社, 1983, 334~337.
- [5] 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.
- [6] Folch J M. Journal of Biology and Chemistry, 1957, 226: 497~509.
- [7] 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.