

生物油脂高产菌株筛选方法研究

宋安东^{1*} 冯冲^{1,2} 王凤芹¹ 谢慧¹

(1. 河南农业大学生命科学学院 河南 郑州 450002)

(2. 中州大学实验管理中心 河南 郑州 450044)

摘要: 本文采用脂肪粒计数法、苏丹 III 菌泥染色法、碳饥饿检出法等对生物油脂高产菌株进行了筛选比较研究。通过试验表明, 苏丹 III 菌泥染色法简便快捷, 其结果与菌体的油脂含量有较好的相关性, 此法是筛选产脂菌株的较理想的初筛方法。碳饥饿检出法准确性较高, 但过于繁琐; 相比之下, 脂肪粒计数法虽简便, 但缺乏准确性, 使用时必须同时考虑脂肪粒的大小。通过筛选, 获得了一株生物油脂高产菌株 IFFI01368, 其菌体中油脂含量为 54.25%。

关键词: 生物油脂, 筛选方法, 脂肪粒, 油脂含量

Research of Screening Method of the High Bio-oil Production Microorganisms

SONG An-Dong^{1*} FENG Chong^{1,2} WANG Feng-Qin¹ XIE Hui¹

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

(2. Experimental Management Centre, Zhongzhou University, Zhengzhou, Henan 450044, China)

Abstract: Fat Particles Counting(FPC), Yeast Mud Dying by Sudan III(YMDSIII), Culture of Lacking Carbon(CLC) were compared and approached in the essay. The results show that YMDSIII is simple and direct, its results are better interrelated with oil-producing quantity of yeast. This method is a relatively ideal screening method on choosing oil-producing microorganisms. CLC is relatively accurate, but it is too tedious. By comparison, FPC is simple and convenient, but it is short of accuracy. When it is used, it must consider the size of fat particles. By screening, cellular oil content reached 54.25% (W/W).

Keywords: Bio-oil, Screening method, Fat particles, Oil contents

在高油价时期, 生物柴油的研究、生产及应用是当前研究的重点。生物柴油生产的原料包括植物油、动物油、废弃油脂和微生物油脂。为了弥补生物柴油原料的不足, 遵循“不与人畜争油, 不与地争粮, 不破坏环境”的原则, 利用生物技术将可再生的淀粉、糖、纤维素资源转化生产微生物油脂, 这是

保障生物柴油原料可持续供应的重要途径^[1,2]。微生物油脂(microbial oils)又称为单细胞油脂(single cell oil, SCO), 生物油脂(Bio-oil), 其组成与植物油类似, 主要为中性脂、游离脂肪酸、磷脂及不皂化物, 因其特殊功能而具有潜在的工业开发价值^[3-5]。产油脂微生物主要包括酵母、霉菌、微藻和细菌, 其中以

基金项目: 国家自然科学基金(No. 70741032); 国家农业成果转化资金项目(No. 2006D00070597); 中国博士后科学基金资助项目(No. 20060400797)

* 通讯作者: Tel: 86-371-63555153; E-mail: song1666@126.com

收稿日期: 2008-08-07; 接受日期: 2008-10-17

对酵母菌和丝状霉菌的研究居多^[6],少数产油微生物能在胞内积累超过细胞干重 70%的油脂。木糖和葡萄糖混合糖油脂发酵菌体油脂含量达到 60%以上,为直接利用秸秆水解液制备油脂奠定了基础^[7,8]。李永红等筛选到一株丝孢酵母进行葡萄糖发酵时油脂含量可达到菌体干重的 65%^[9]。利用微生物生产生物油脂有许多优点:微生物细胞增殖快,生产周期短;微生物生长所需的原料丰富,价格便宜,如淀粉、糖类、秸秆,特别是食品工业和造纸行业的废弃物等都可以作为碳源加以利用,从而保护了环境;该生产过程比动植物生产油脂所需的劳动力少,且不受季节、气候变化的限制;能连续大规模生产^[3],生产成本低;同时可以利用细胞融合、细胞诱变、基因工程等手段,使微生物生产出比动、植物油脂更符合人们需要的高营养油脂或某些特定脂肪酸的油脂^[10-12]。

选育适于工业化生产的产脂菌株是一项十分艰巨和繁重的工作,必须建立一个能准确、快速地把产脂性能好的菌株从所在的菌群中分离出来的初筛方法。国内外学者多采用脂肪粒计数法或脂肪粒大小测定法作为产脂菌株的初筛方法,但是单纯根据脂肪粒数目或大小来判定菌体含油量的高低,都会有较大误差。本试验从宏观和微观两方面进行观察。宏观方面,通过观察菌体在平板和试管斜面上的生长情况进行初步筛选,再通过碳饥饿检出法进行再筛选;微观方面,用苏丹黑染色,显微镜下观察脂肪粒数目和大小,苏丹III菌泥染色法观察菌体颜色;最后通过对油脂含量的定量分析进一步证实了筛选结果。这为准确、快速地筛选高产脂菌株提供了有效方法。

1 材料与方法

1.1 菌种 (表 1)

1.2 培养基及试剂

1.2.1 麦芽汁培养基: 糖度为 12°Bé~13°Bé 的麦芽汁, pH 自然, 灭菌条件: 0.1 MPa, 20 min。用于菌种活化和保藏培养基。

1.2.2 酵母产脂培养基: 0.8%酵母浸出汁, 0.3%蛋白胨, 10%葡萄糖, pH 5.8, 灭菌条件: 0.1 MPa, 20 min。

1.2.3 霉菌产脂培养基: 葡萄糖 10%, 酵母膏 0.15%, 麦芽汁 0.05%, 硫酸铵 0.05%, 硫酸镁 0.1%, 磷酸二氢钾 0.7%, 硝酸铵 0.25%, FeSO₄、CaCl₂、CuSO₄、ZnSO₄ 适量, pH 7.4, 灭菌条件: 0.1 MPa, 20 min。

1.2.4 缺碳培养基: 酵母产脂培养基: 0.2%酵母浸出汁, 0.3%蛋白胨, pH 5.8, 灭菌条件: 0.1 MPa, 20 min。

霉菌产脂培养基: 酵母膏 0.15%, 硫酸铵 0.05%, 硫酸镁 0.1%, 磷酸二氢钾 0.5%, 硝酸铵 0.25%, FeSO₄、CaCl₂、CuSO₄、ZnSO₄ 适量, pH 7.4, 灭菌条件: 0.1 MPa, 20 min。

1.2.5 苏丹黑 B 染色液^[13]: 苏丹黑 B 0.25 g, 70%酒精 100 mL。

1.2.6 苏丹 染色液: 以 95%乙醇为溶剂, 配成 0.2%(M/V)苏丹 III 溶液。

1.3 试验方法

1.3.1 产脂发酵: 将经活化的菌种按 10%的接种量转接于液体产脂培养基中, 28°C、150 r/min 振荡发酵。

1.3.2 生物量测定: 将培养液 4500 r/min 离心 10 min, 收集菌体并干燥, 得到干菌体, 准确称重。

表 1 试验用菌株
Table 1 Experimental strains

| 菌株种类 Strain class | 中文名 Chinese name | 拉丁文 Latin | 菌株编号 No. | 来源 Resource |
|----------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| 酵母菌 Yeast | 发酵性丝孢酵母 | <i>Trichosporon fermentar</i> | IFFI01368 | 中国食品发酵工业研究 |
| | 皮状丝孢酵母 | <i>Trichosporon cutaneu</i> | IFFI01367 | 中国食品发酵工业研究 |
| | 头状丝孢酵母 | <i>Trichosporon capitatu</i> | As2.1385 | 中科院微生物所 |
| | 油脂酵母 | <i>Lipomyces starkeyi</i> | As2.1390 | 中科院微生物所 |
| | 橘林油脂酵母 | <i>Lipomyces konoenkoi</i> | IFFI01714 | 中国食品发酵工业研究 |
| 霉菌 Mould | 葡萄酒被孢霉 | <i>Mortierella vinacea</i> | As3.3414 | 中科院微生物所 |
| | 深黄被孢霉 | <i>Mortierella isabellina</i> | As3.3410 | 中科院微生物所 |
| | 布拉克须霉 | <i>Phycomyces blakesleeana</i> | As3.2061 | 中科院微生物所 |

1.3.3 油脂提取^[14]: 精确称取一定量粉碎后的干菌体, 每克干菌体添加 40 mL 盐酸水解, 室温下静置 20 min, 沸水浴加热 10 min, 加入适量氯仿-甲醇 (2:1, V/V), 振荡 30 min, 然后在 4500 r/min 下离心 15 min, 分层, 取氯仿层, 真空干燥除去氯仿即得油脂, 计算油脂含量。

1.4 筛选方法

1.4.1 脂肪粒计数法: 从固体产脂培养基上挑取菌体涂片, 热固定, 加入一滴苏丹黑 B 染色液染色 15 min, 倾去染料, 二甲苯冲洗至洗脱液无色, 再用蕃红复染 2 min, 水洗、吸干后镜检。细胞和菌丝呈红色, 菌体内的脂肪颗粒呈蓝黑色^[15]。

1.4.2 缺碳培养基检出法: 将固体产脂培养基上的菌体点接至缺碳培养基上, 在 28℃~30℃ 下培养, 48 h 后开始观察菌体的生长情况。

1.4.3 苏丹 菌泥染色法: 将滤纸覆盖在培养好的菌体上, 用手轻压, 把沾有菌体的滤纸置于 50℃ 下干燥 20 min 后, 将其浸入苏丹 染色液中染色 20 min, 再将滤纸浸入 95%乙醇中脱色 3 min, 观察滤纸上菌体颜色。

2 结果与分析

2.1 菌体生长情况观察

由表 2 可知, 平板菌体经一次活化的 IFFI 01368、IFFI01367 和 IFFI01714 经平板培养 2 d 后长势甚佳, 其他长势较慢。

2.2 脂肪粒计数法

生物脂肪大多以脂肪粒的形式存在于细胞内, 将细胞制成样品后用苏丹黑染色, 便可在显微镜下观察到被染成蓝黑色的脂肪粒。一般常用脂肪粒计数法初步判定菌体内油脂含量的多少。

2.2.1 显微观察的脂肪粒: 从图 1~5 可知, 该方法明显地看到了菌体中的脂肪粒, 其中 01368 的脂肪粒最大最明显, 01367 次之, 说明这两种菌株含油率比较高, 而其它菌体脂肪粒不明显, 甚至看不到脂肪粒。

2.2.2 同一菌株中不同抽样细胞间脂肪粒数目的差异: 每一菌株随机抽取 5 个细胞测定脂肪粒数目, 取平均值, 结果见表 3。

从表 3 可以看出, 01367 的脂肪粒数目最多, 说

表 2 斜面菌体生长情况
Table 2 Incline mycelium growth situation

| 菌种 Strain | 培养时间 Culture time | | |
|--------------|-------------------|-----------|-----------|
| | 一次活化 48 h | 一次活化 65 h | 二次活化 60 h |
| IFFI01368 | ++++ | ++++ | ++++ |
| IFFI01367 | ++++ | ++++ | ++++ |
| IFFI01714 | ++++ | ++++ | ++++ |
| As2.1390 | +++ | ++++ | ++++ |
| As2.1385 | +++ | +++ | ++++ |
| As3.3414 | ++ | +++ | ++++ |
| As3.3410 | ++ | +++ | ++++ |
| As3.2061 | + | ++ | ++ |

注: - : 不生长; +、++、+++、++++: 菌落生长旺盛程度。
Note: -: Not growth; +, ++, +++, +++++: High level of colony growth.

表 3 不同菌株细胞内脂肪粒数目
Table 3 Number of fat particles in different yeast

| 菌株 Strain | 脂肪粒数目/个细胞 Number of fat particles/cell | | | | | 平均值 |
|--------------|--|------|------|------|------|-----|
| | 细胞 1 | 细胞 2 | 细胞 3 | 细胞 4 | 细胞 5 | |
| 01368 | 8 | 6 | 10 | 7 | 10 | 8.2 |
| 01367 | 12 | 8 | 11 | 8 | 9 | 9.6 |
| 01714 | 5 | 3 | 4 | 2 | 4 | 3.6 |
| 2.1390 | 4 | 1 | 5 | 2 | 4 | 3.2 |
| 2.1385 | 2 | 5 | 3 | 7 | 3 | 4 |
| 3.3414 | 2 | 3 | 1 | 4 | 2 | 2.4 |
| 3.3410 | 4 | 3 | 3 | 1 | 5 | 3.2 |
| 3.2061 | 1 | 4 | 2 | 1 | 2 | 2 |

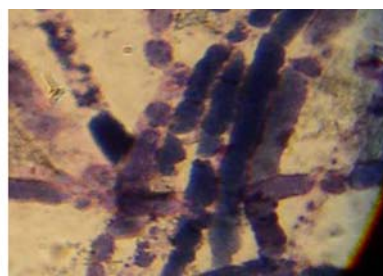
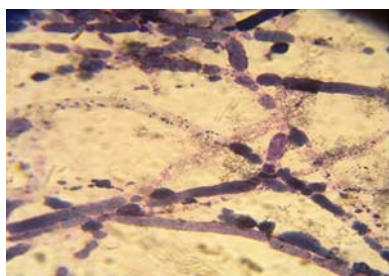


图 1 01368 苏丹黑染色

Fig. 1 01368 stained with Sudan Black B

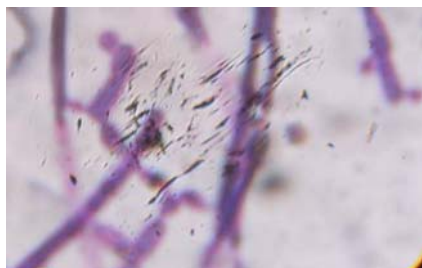


图 2 01367 苏丹黑染色

Fig. 2 01367 stained with Sudan Black B



图 5 3.3410 苏丹黑染色

Fig. 5 3.3410 stained with Sudan Black B

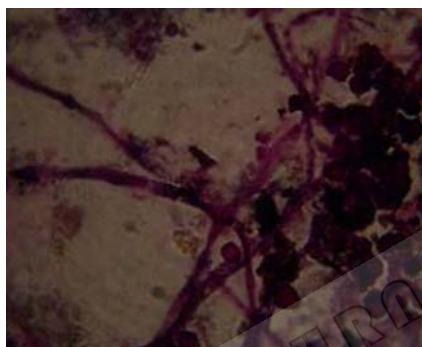


图 3 3.2061 苏丹黑染色

Fig. 3 3.2061 stained with Sudan Black B

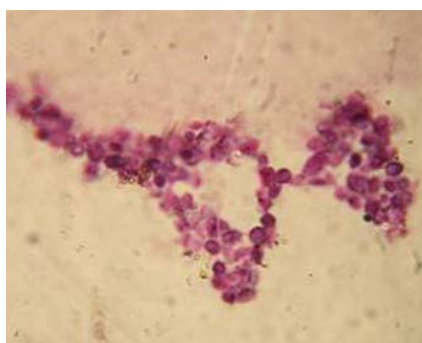


图 4 2.1390 苏丹黑染色

Fig. 4 2.1390 stained with Sudan Black B

明该菌株是高产油脂的优良菌株。但从图 1 可以看出, 01368 的脂肪粒比较大, 这可能是由脂肪粒之间的相互重叠引起的, 由此可以推断 01368 的产油率

不一定比 01367 低。

脂肪粒计数法的随机误差较大, 其误差主要是由计数者的操作引起的。由于酵母细胞较小, 当其所含的脂肪粒个数较多时, 脂肪粒之间互相重叠, 因而在计数时就可能出现漏数的情况; 另外, 计数者在计数过程中也会因为视觉疲劳而造成误差。

2.3 碳饥饿检出法

微生物细胞内的脂肪粒作为一种碳素储藏物, 当菌体处于碳饥饿状态时, 被降解用于菌体生长, 因此, 在缺碳培养基上油脂含量越高越具生长优势。根据这一差别, 就可以检出产脂能力强的菌株。油脂含量高的菌株在缺碳培养基上出现菌落的时间早, 反之, 油脂含量越低, 菌落出现的时间越迟^[16]。

由表 4 可知, 01368 第 5 天出现菌落, 说明产油能力强。从油脂含量测定上也证明了这一点。3.3414 菌株与 3.3410、3.2061 菌株含油率相差 1% 左右, 菌落出现的时间几乎相同。这一方法所得结果与菌体油脂含量之间有较好的一致性, 但这种方法操作繁琐、费时。

2.4 苏丹 菌泥染色法

含油脂菌体在苏丹 染色时, 颜色的变化与菌

体含油量之间有更好的相关性, 并呈现一定的规律, 低脂菌体颜色偏红, 高脂菌体颜色偏灰。

表 4 产脂菌株在缺碳培养基上的生长情况
Table 4 Growth of the oil-product microorganisms with CLC

| 菌株 Strain | 菌体油脂含量(%) Oil content in body | 菌落出现时间(d) Appear time of colony |
|--------------|----------------------------------|------------------------------------|
| 01368 | 54.25 | 5 |
| 01367 | 48.2 | 7 |
| 01714 | 14.7 | 10 |
| 2.1390 | 8.3 | 11 |
| 2.1385 | 5.8 | 12 |
| 3.3414 | 2.1 | 13 |
| 3.3410 | 1.03 | 13 |
| 3.2061 | 1.9 | 13 |

由表 5 可以看出, 用 2 种方法排序结果基本相符, 即菌体颜色越偏灰产油率越高, 菌体颜色越偏红产油越低。所以苏丹 III 菌泥染色法有较好的准确性(比脂肪粒计数法和碳饥饿检出法高), 且操作十分简便, 是一种理想的初筛方法。

综合 3 种筛选方法可以看出, 显微镜下观察到 01368 脂肪粒大而明显, 但 01367 数目最多, 而碳饥饿检出法又说明 01368 菌落出现时间最早, 最后又通过苏丹 III 菌泥染色法看到 01368、菌泥颜色最深。这几种方法呈现出高度的一致性, 共同说明 01368 产油率最高, 结果具有一定的准确性、可靠性。利用此法筛选到一株高产生物油脂菌株——发酵性丝孢酵母 IFFI01368, 其菌体的油脂含量为 54.25%。

3 结论及讨论

3.1 结论

苏丹 III 菌泥染色法是一种较为理想的初筛方法, 其与菌体油脂含量之间关系呈现出高度的一致性且操作简便、准确性高; 碳饥饿检出法准确性较高, 但操作繁琐、费时; 而脂肪粒计数法虽简便, 但准确性不高。若采用此法作为产脂菌株的初筛方法, 应同时考虑脂肪粒大小, 才能得出比较客观的结论。相比之下, 采用苏丹 III 菌泥染色法判定菌体油脂含量高低更具可靠性。

本试验最终筛选出高产油脂菌株 IFFI01368, 其油脂含量为 54.25%。

3.2 讨论

我们还将摇瓶的染色效果同从琼脂平板上直接挑取的菌丝进行了比较, 发现直接挑取的菌丝的染色不均匀染色效果不及摇瓶菌丝。可能是由于菌丝在平板上生长吸收养分不均匀。菌丝顶端的幼嫩部分含有脂类物质较少的原因。

在产脂菌株的筛选方面, 还存在其他可行方法, 但由于实验室条件有限, 本试验只采用了脂肪粒计数法、苏丹 III 菌泥染色法和碳饥饿检出法 3 种筛选方法。在初步筛选出高产脂菌株 01368 之后, 下一步将对这两种菌株进行产脂条件优化, 改进发酵工艺, 降低发酵成本, 建立高效、简单的多不饱和脂肪酸提取浓缩技术等。最终将微生物油脂进行转酯化变成生物柴油, 生产可再生清洁能源, 以缓解全球性能源短缺问题。

表 5 苏丹III染色后菌泥颜色与菌体含油率的相关性
Table 5 The interrelation of the strain mud color after sudan III stain to oil content

| 菌株 Strain | 苏丹III染色法 YMDSIII | | 油脂抽取 Oil extraction | |
|--------------|-----------------------------|------------------|------------------------|------------------|
| | 感官判断 Sense determination | 含油排序 Sequence | 油脂含量(%) Oil content | 含油排序 Sequence |
| 01368 | +++ | 1 | 54.25 | 1 |
| 01367 | ++ | 2 | 48.2 | 2 |
| 01714 | + | 3 | 14.7 | 3 |
| 2.1385 | + | 4 | 5.8 | 5 |
| 2.1390 | - | 5 | 8.3 | 4 |
| 3.3414 | - | 6 | 2.1 | 6 |
| 3.3410 | - | 7 | 1.03 | 8 |
| 3.2061 | - | 8 | 1.9 | 7 |

注: +、-: 分别表示接近高脂、低脂菌体颜色的程度。

Note: +, -: That were close to the high-fat, low-fat level of the cell color.

参 考 文 献

- [1] 赵宗保, 华艳艳, 刘 波. 中国如何突破生物柴油产业的原料瓶颈. 中国生物工程杂志, 2005, **25**(11): 1-6.
- [2] 孟祥梅, 张晓东, 陈 雷, 等. 制取生物柴油的新型原料油源的探讨. 现代化工, 2006, **26**(22): 1-4.
- [3] Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, *et al.* Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 308-312.
- [4] 薛飞燕, 张 栩, 谭天伟. 微生物油脂的研究进展及展望. 生物加工过程, 2005, **3**(1): 23-27.
- [5] 颜 治, 陈 晶. 微生物油脂及其开发利用研究进展. 粮食与油脂, 2003, **7**: 13-15.
- [6] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochemical Society Transactions*, 2002, **30**(6): 1047-1050.
- [7] 孔祥莉, 刘 波, 赵宗保, 等. 斯达氏油脂酵母利用混合糖发酵产油脂. 生物加工过程, 2007, **5**(2): 36-41.
- [8] Certik M, Shimizu SS. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87**: 1-14.
- [9] 李永红, 刘 波, 孙 燕, 等. 广谱碳源产油酵母菌的筛选. 中国生物工程杂志, 2005, **25**(12): 39-44.
- [10] 武 双, 华艳艳, 仲崇斌, 等. 色醇对斯达氏油脂酵母产油能力的影响. 微生物学通报, 2008, **35**(2): 200-203.
- [11] Ratledge C, Wynn JP. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, **51**: 1-51.
- [12] 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.
- [13] 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, p.89.
- [14] 曹 健, 汪晨辉, 曾 实, 等. 卷枝毛霉 *Mucorcircinelloides* 3.2208 油脂几种提取方法的比较. 中国油脂, 2004, **27**(4): 38-40.
- [15] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983, pp.32-34.
- [16] Osamu H. Application of maxblend fermentor for microbial processes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1997, **83**(1): 79-86.

征订启事

《中国中医药现代远程教育》杂志征订征稿广告启事

《中国中医药现代远程教育》杂志是国家中医药管理局主管的国家级中医药科技期刊, 中国科技核心期刊, 中国科技期刊统计源期刊, 中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)中国期刊全文数据库(CAJED)及中国核心期刊《遴选》数据库, 中国期刊全文数据库收录期刊, 中国期刊网全文数据库收录期刊, 每月 8 日出版, 全彩印刷, 国内统一刊号 CN11---5024 / R 国际刊号 ISSN1672—2779。每册定价: 15 元, 全年 180 元。

《中国中医药现代远程教育》杂志服务于全国医药卫生及相关行业的科技人员, 是我国唯一传播中医药及中医药远程教育资讯的中医药科技期刊, 是中医药科教研及大中专学生的教辅, 是中医药临床教研人员的益友, 也是中医药远程网络教育学员的教参。欢迎订阅, 全国邮局均可征订。国内邮发代号: 82—107, 国外代号 N-1751。凡在当地订阅有困难者, 可直接与本刊发行部发行。广告许可证号: 京朝工商广字第 8091 号。欢迎刊登广告。

本刊主要栏目分四大版块: 一是临床版块: 临床专著 薪火传承 护理讲坛 临证精华 临床报道 他山之石。二是科研版块: 学术论著 实验研究 科研进展。三是远教版块: 中远论坛(教育与管理论坛) 远教辅导 试题解析 继教讲堂 名师讲座 用药精讲。四是时政与文化版块: 特稿特讯 大医精诚 医海泛舟 杏林文苑 综合资讯

来稿应精练、通顺、重点突出, 有新意。论著综述一般不超过 5000 字, (包括阅表、参考文献), 讲座; 临床病理(例)讨论类文稿可视情况而定。论著摘要(简报)病理报告等 800—2000 字, 来稿请打印, 并附光盘或电子邮箱投稿。

来稿请寄: 地址: 北京市复兴门南大街甲 2 号配楼知医堂 101 室 邮编: 100031 在线投稿信箱:

zyygy2008@126.com zhongyuan@ichinamd.com 本刊官方网站: zhongyuan.itcmedu.com

联系电话: 010-51813289

010-51813298

传真: 010-51813296

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>