

# *Cryptococcus curvatus* O3 酵母菌培养 及产油脂特性

张 杰<sup>1\*</sup> 张晓东<sup>1</sup> 许海朋<sup>1</sup> 李 岩<sup>1</sup> 赵保峰<sup>1</sup> 陈 雷<sup>1</sup> 赵宗保<sup>2</sup> 孙 立<sup>1</sup>

(1. 山东省科学院能源研究所 山东 济南 250014)

(2. 中国科学院大连化学物理研究所生物技术研究部 辽宁 大连 116023)

**摘 要:** 生物柴油的发展, 导致全球油脂供求紧张。微生物油脂的甘三酯组成与植物油类似, 发展微生物油脂可部分缓解植物油供应压力。本文研究了 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母利用葡萄糖为碳源生长和积累油脂的特性。*Cryptococcus curvatus* O3 酵母在培养过程中能适应间歇式碳源流加方式达到高密度培养的目的, 但在相同培养条件下, 不同氮源能影响其代谢过程中糖到油脂转化的脂肪系数。*Cryptococcus curvatus* O3 酵母利用葡萄糖作为碳源在 30°C 下摇瓶发酵, 菌体生物量为 51.8 g/L, 油脂含量达 65.1%。脂肪酸组成分析结果表明, 菌油富含饱和及低度不饱和长链脂肪酸, 其中饱和脂肪酸之和占总脂肪酸组成的 64% 左右, 其脂肪酸组成类似于可可脂, 这些结果对于利用产油微生物转化生物质获取如类可可脂等具有高附加值油脂的研究具有重要意义。

**关键词:** *Cryptococcus curvatus* O3 酵母, 发酵培养, 微生物油脂, 脂肪酸

## The Cultivation and Lipids Accumulation of *Cryptococcus curvatus* O3 Yeast

ZHANG Jie<sup>1\*</sup> ZHANG Xiao-Dong<sup>1</sup> XU Hai-Peng<sup>1</sup> LI Yan<sup>1</sup> ZHAO Bao-Feng<sup>1</sup>  
CHEN Lei<sup>1</sup> ZHAO Zong-Bao<sup>2</sup> SUN Li<sup>1</sup>

(1. Energy Research Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan, Shandong 250014, China)

(2. Laboratory of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics CAS, Dalian, Liaoning 116023, China)

**Abstract:** Recent demand for biodiesel worldwide has turned vegetable fats into an ever-growing and substantial consumption resource. In this regard, microbial lipids which triacylglycerol (TAG) is similar to the vegetable fats, may be a prospective alternative feedstock for biodiesel industry. Described herein are preliminary screening studies on *Cryptococcus curvatus* O3 strain for assimilation glucose to produce microbial lipids. *Cryptococcus curvatus* O3 When cultivated by shaking flask at 30°C with glucose as sole carbon source, cellular biomass and lipid content were 51.8 g/L and 65.1%. Therefor *Cryptococcus curvatus* O3 strain can be defined as an oleaginous yeast. Gas chromatography analysis of microbial lipids revealed that major constituent fatty acids were palmitic acid, oleic acid and linoleic acid. The percentage of SFA (saturated fatty acid) in the lipid of *Cryptococcus curvatus* O3 is 64%. Such compositional feature was quite similar to

cocoa butter, one of the high quality vegetable fats. Therefore, the oleaginous yeast could be considered as an ideal host for fermentation of biomass for lipids.

**Keywords:** *Cryptococcus curvatus* O3 yeast, Fermentation, Microbial lipids, Fatty acids

近年, 由于能源概念的渗入, 全球油脂供需格局正在发生改变, 其价格也正被重新定位。微生物油脂是继植物油脂、动物油脂之后出现的又一类油脂新资源。它由微生物在适宜条件下转化碳水化合物、碳氢化合物和其他可代谢有机物获得并在菌体内大量贮存, 少数微生物油脂含量可达菌体干重的70%以上<sup>[1]</sup>。人们通过菌种筛选、优化培养条件及基因工程改造等手段已经获得了多种高产油脂的微生物。李永红等通过优化圆红冬孢酵母 *R. toruloides* Y4 生产油脂发酵工艺, 油脂含量可达菌体干重的76.1%<sup>[2]</sup>。微生物油脂是一种值得关注的新技术, 它可由农产品或者毫无价值的农业废弃物转化获得, 同依赖油料植物获取油脂的传统方法相比, 该技术具有可连续生产、周期短、不受季节和气候影响、原料来源广泛的优点, 产品可用于制取生物柴油、类可可脂及高档食用调和油等, 高值化潜力大, 因此具有广阔的工业化应用前景。

本研究考察了 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母以葡萄糖为碳源发酵生产油脂的特性, 并对培养基中葡萄糖浓度、不同氮源对生长和产油能力的影响及其油脂的脂肪酸组成等进行了初步探讨。实验结果对于下步优化培养条件, 提高 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母产油能力并获得高值化产品具有重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Cryptococcus curvatus* O3 酵母经甘薯及菊芋水解液多次传代, 现保存于本实验室。

### 1.2 培养

**1.2.1 培养基:** 无机盐溶液(g/L):  $\text{NH}_4\text{Cl}$  25,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  350,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  75,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5。

YEPD 培养基组成(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 10, 蛋白胨 10, pH 自然, 作为种子培养基; 斜面培养基在 YEPD 基础上加入琼脂粉 15。

限氮发酵培养基 1 (g/L): 葡萄糖 60, 酵母粉 10, 蛋白胨 10, pH 自然。C (mol): N (mol)=18.3。

限氮发酵培养基 2 (g/L): 无机盐溶液 10 mL, 葡萄糖 60, 酵母粉 0.75, pH 自然。C (mol): N (mol)=315.8。

限氮发酵培养基 3 (g/L): 无机盐溶液 40 mL, 葡萄糖 60, 酵母粉 0.75, pH 自然。C(mol): N (mol)=127.1。

限氮发酵培养基 4 (g/L): 无机盐溶液 200 mL, 葡萄糖 60, 酵母粉 0.75, pH 自然。C(mol): N (mol)=30.4。

限氮发酵培养基 5 (g/L): 无机盐溶液 10 mL, 葡萄糖 30, 酵母粉 0.75, pH 自然。C (mol): N(mol)=156.3。

以上培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 饱和蒸汽下灭菌 15 min; 高压过程会破坏少许葡萄糖, 灭菌结束后发酵培养基的葡萄糖浓度为 54 g/L。

**1.2.2 培养方法:** 将新鲜斜面上的 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母接种于 50 mL 液体种子培养基中, 于 30°C、200 r/min 摇床振荡培养; 以 10%接种量接种于 50 mL 限氮发酵培养基中, 在相同条件下培养, 培养时间按具体培养确定。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 菌体生物量测定:** 菌体离心收集, 蒸馏水洗 3 次, 湿菌体于 65°C 烘 24 h 至恒重, 以 g 干菌体/L 发酵液表示菌体生物量。

**1.3.2 菌体油脂的抽提:** 干菌体盐酸破壁, 采用氯仿-甲醇法进行油脂抽提<sup>[3]</sup>。

**1.3.3 残糖的测定:** DNS 法。

**1.3.4 油脂脂肪酸组成分析:** 按文献方法对菌油脂脂肪酸进行甲酯化, 样品利用气相色谱仪分析, 色谱条件如下: FFAP 石英毛细管柱(30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ ); 进样器温度 250°C; 进样量 0.5  $\mu\text{L}$ ; 载气  $\text{N}_2$  2720 mL/min, 检测器(FID)温度 250°C; 柱温 120°C 维持 2 min 后以 15°C/min 升至 150°C, 再以 5°C/min 升至 220°C 维持 5 min。用面积归一法确定相对含量。

## 2 结果与讨论

**2.1 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母生长曲线**  
在液体种子培养基中培养, 采用分光光度计

( $OD_{600}$ )测定不同时间菌悬液吸光度, 取对数与对应时间绘制生长曲线(如图 1)。

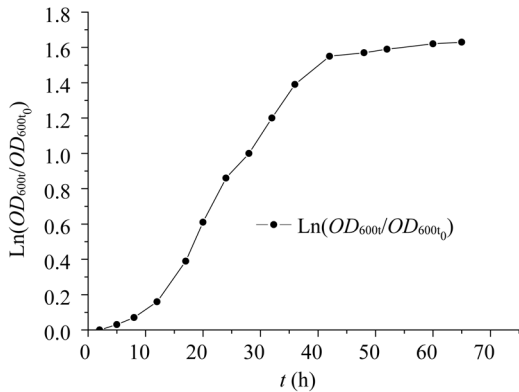


图 1 *C. curvatus* O3 在 YEPD 中的生长曲线  
Fig. 1 Growth curve of *C. curvatus* O3 in YEPD

经过分析发现, 在 25 h~35 h 时 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母生长快且菌体浓度大, 综合考虑可选在 30 h~35 h 进行接种。

2.2 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母形态观察及产油脂能力测定

2.2.1 形态观察: 限氮发酵培养基 1、2、5 培养至

葡萄糖耗尽, 测生物量及油脂含量。  
限氮发酵培养基 2 分别在 24 h、48 h、120 h 取样, 油脂含量为 8.92%、17.6%和 58.5%; 菌体形态(如图 2 A、2B、2C)。

*Cryptococcus curvatus* O3 酵母菌在培养开始阶段主要为菌体增值过程, 由于营养(特别是氮源)丰富, 出现假丝, 内含较小的绿色油滴(如图 2A); 伴随培养时间增长, 氮源逐渐耗尽, 生长过程由菌体增值转变为油脂积累, 假丝断裂, 内部油滴逐渐变大, 油脂含量提高(如图 2B); 在培养末期, 油脂含量达到 58.5%时, 菌体内出现 1~5 个较大油滴, 菌体也变成椭圆形或近于圆形(如图 2C)。

表 1 葡萄糖碳源发酵产油脂 Table 1 Lipids fermentation of glucose			
Substrate	Biomass(g/L)	Lipid content (%, W/W)	Lipid coefficient (g/100 g glucose)
1	20.1 ± 0.6	44.3 ± 1.3	16.5 ± 0.5
2	22.8 ± 0.7	58.5 ± 1.2	24.7 ± 0.8
5	11.3 ± 0.4	38.1 ± 0.7	14.4 ± 0.4

注: 每组作两个平行对照, 取平均值。  
Note: Every test was repeated one time for each group and the mean value is regarded as the final result.

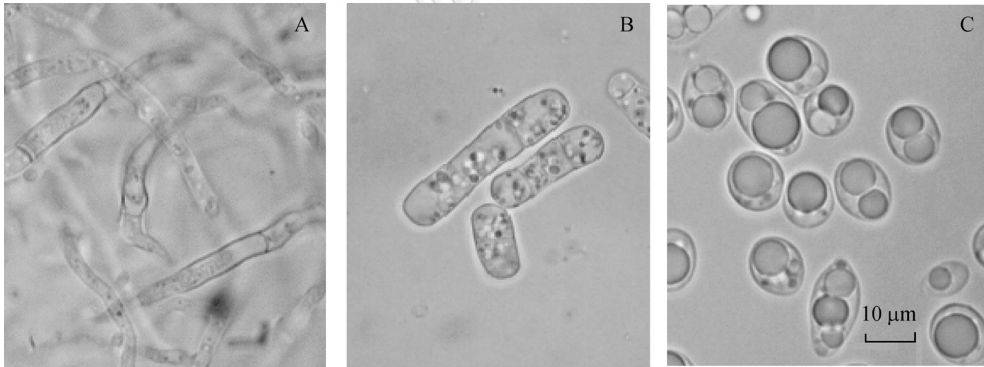


图 2 光学显微镜下菌体形态(100×)  
Fig. 2 Light micrograph of *C. curvatus* O3, cultivated for different time

脂肪系数是评价产油微生物经济性的重要指标, 脂肪系数越高, 表明菌体对底物的利用效率越好。根据油脂生物合成途径分析, 理论上每 100 g 葡萄糖可产生约 33 g 甘油酯, 即脂肪系数为 33。由于部分碳源要用于合成其它非脂类物质, 实际上脂肪系数很少超过 25<sup>[4]</sup>。*Cryptococcus curvatus* O3 在限氮发酵培养基 2 中培养, 油脂含量达到 58.5%, 脂肪系数为 24.7, 说明该菌株在生产过程中具有很好的产油脂能力且底物利用效率很高, 具有非常好的工业

化生产潜力。  
2.3 葡萄糖及氮源对 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母生长的影响  
2.3.1 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母葡萄糖抑制试验: 高密度培养是生产高质量的浓缩型菌体和代谢产物的重要环节, 是微生物能否以低成本实现规模生产的关键性因素。Hassan 等通过优化 *Apiotrichum curvatum* 酵母培养条件, 经过连续培养获得 14.5 g/L 的生物量和 45.6%的油脂含量<sup>[5]</sup>。Evans 等研究

*Candida curvatus* 酵母在利用不同碳源连续培养积累油脂时发现, *Candida curvatus* 酵母利用木糖发酵时油脂含量最高达到 49%, 但生物量均未超过 14 g/L<sup>[6]</sup>。可以看出连续培养在某种程度上很难实现高密度培养, 相比而言, 分批补料培养方式能在较短时间内实现高密度培养, 因而在微生物油脂生产中得到广泛应用。

为了得到一种适合于 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母的分批补料培养方式, 首先在摇瓶批式发酵考察了葡萄糖的初始浓度对发酵产油的影响。选取葡萄糖浓度由 10 g/L 到 400 g/L 进行摇瓶发酵培养, 测菌液吸光度、菌体生物量及油脂含量。

当葡萄糖浓度在 10 g/L~60 g/L 变化时, 菌体生长速度随葡萄糖浓度增加而加快; 在 90 g/L~120 g/L 变化时, 菌体生长速度相差不大, 但略低于 60 g/L 时; 在 150 g/L~200 g/L 变化时, 葡萄糖对菌体生长产生明显的抑制作用; 当葡萄糖浓度增加到 300 g/L 时, 菌体几乎不生长(如图 3)。培养 120 h 后测菌体生物量(如图 4), 当葡萄糖浓度从 10 g/L 变化到 60 g/L 时, 生物量和油脂逐渐增加; 然而当葡萄糖浓度增加到 90 g/L、120 g/L 时生物量较 60 g/L 时略有下降, 但基本持平, 油脂含量由 8.91 g/L 降到 8.53 g/L 和 8.24 g/L; 糖浓度进一步增加至 150 g/L、200 g/L 时, 生物量明显下降, 说明葡萄糖对菌体生长产生一定的抑制作用; 当葡萄糖的浓度增至 300 g/L、400 g/L 时, 油脂含量几乎为零。

在发酵生产中, 如果培养基中葡萄糖浓度过高, 发酵液非常粘稠, 将会导致传质状况很差, 大量能量被消耗于非生产用途, 造成浪费, 对产物的合成

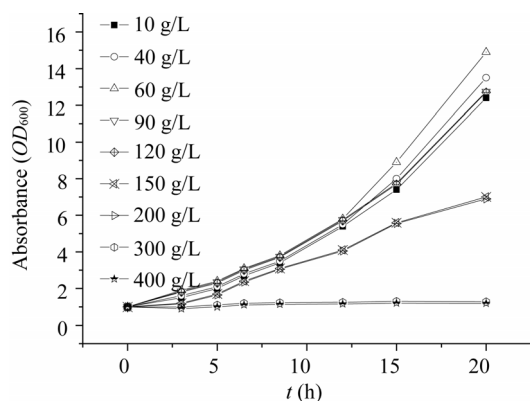


图 3 葡萄糖对生长的影响

Fig. 3 Effect of initial glucose concentrations on initial glucose

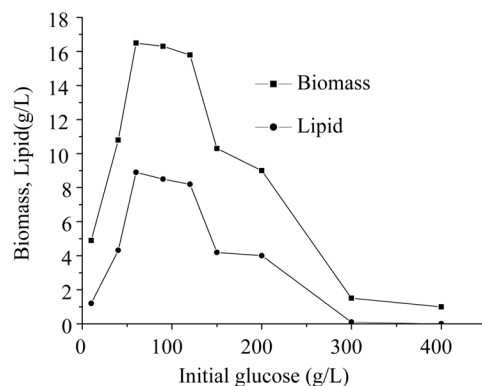


图 4 不同糖浓度下菌体生物量和油脂积累量

Fig. 4 Biomass and lipid on giving *C. curvatus* O3 cell growth

不利。另外, 过高的渗透压也会抑制微生物的生长。实验结果表明 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母在葡萄糖低于 120 g/L 时都没有出现明显的底物抑制现象, 这说明 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母能耐较高的渗透压, 这使得培养过程中采用间歇式流加较浓葡萄糖的分批补料发酵方式成为可能。

**2.3.2 *Cryptococcus curvatus* O3 氮源影响试验:** 油脂微生物在培养基中碳源充足而氮源缺乏时, 代谢活动转为以消耗碳源并合成和积累油脂为主, 将过量的碳水化合物转化为油脂。因此, 培养基中碳、氮源浓度及 C/N 比是影响微生物油脂含量的主要因素<sup>[7]</sup>。

限氮发酵培养基 1、3、4 培养至葡萄糖浓度低于 15 g/L 时补加 500 g/L 葡萄糖 5 mL, 培养至葡萄糖耗尽。该过程总的底物浓度为 154 g/L。

从表 2 分析发现, 在培养基中总氮含量 1 > 4 > 3 且培养基 1 和 4 含氮量相差不大的情况下, 限氮发酵培养基 1(有机氮)中生物量最低但油脂含量最高,

表 2 氮源对发酵产油的影响  
Table 2 Effects of nitrogen sources on the growth and lipid production of *C. curvatus* O3

Substrate*	Biomass(g/L)	Lipid content (% W/W)	Lipid coefficient (g/100 g glucose)
1	51.8 ± 1.6	65.1 ± 2.3	21.9 ± 0.8
3	85.1 ± 2.5	13.3 ± 0.3	7.34 ± 0.4
4	136 ± 6.1	5.17 ± 0.3	4.56 ± 0.2

注: 每组作两个平行对照, 取平均值; \*: 限氮培养基经批次补糖至底物浓度为 154 g/L。

Note: Every test was repeated one time for each group and the mean value is regarded as the final result. \*: Glucose was supplied to the nitrogen-limited medium until the total concentration reached 154 g/L.

而限氮培养基 4(无机氮和有机氮)中却恰恰相反;限氮发酵培养基 3、4 中生物量均很高,但油脂含量很低且伴随无机氮含量增加,生物量增加而油脂含量降低,通过脂肪系数变化可以看出,碳源主要被非脂类物质的合成所占用。以上结果表明培养基中的碳氮比是影响油脂含量的主要因素,其中无机氮源较有利于细胞繁殖,而有机氮源既有利于细胞生长又有利于其油脂合成,这与 Ratledge 的研究基本一致<sup>[8]</sup>。

#### 2.4 油脂脂肪酸组成

产油微生物胞内积累的油脂以甘油酯为主,在脂肪酸组成上与一般植物油脂相似,仍以 C16、C18 系脂肪酸,如棕榈酸、硬脂酸、油酸和亚油酸为主<sup>[9]</sup>。其它脂肪酸,如亚麻酸(GLA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)以及存在于一些变异株中的一些特殊脂肪酸。*Cryptococcus curvatus* O3 酵母在 2、5 培养基中利用葡萄糖发酵的油脂脂肪酸组成分析结果(采用面积归一化法进行计算)如表 3 所示。

表 3 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母油脂与天然可可脂脂肪酸组成比较

Table 3 Fatty acids compositions of lipid extracted from *C. curvatus* O3 compared with CB

Fatty acids	CBE(5)	CBE(2)	Cocoa butter(CB)
C16 : 0	25.9	30.1	23~30
C18 : 0	34.3	18.5	32~37
C18 : 1	26.5	39.3	30~37
C18 : 2	7.1	8.3	2~4
C18 : 3	0.8	1.2	—
C24 : 0	1.0	1.5	—
% SFA	64	50.7	60~64

限氮培养基 2 和 5 的区别是培养基 5 中增大了底物葡萄糖的浓度,伴随葡萄糖浓度的增加,发酵结束时菌体油脂含量由 38.1%提高到了 58.5%。由表 3 可以看出,限氮培养基 5 中,油脂脂肪酸组成与天然可可脂非常类似,其中饱和脂肪酸占总脂肪酸的 64%与天然可可脂的 60%~64%接近,因此其具有制造类可可脂的潜力,甘三酯的结构需要进一步分析。比较 CBE(5)和 CBE(2)会发现,随着底物糖浓度增加和培养时间的延长,油脂中十八碳饱和脂肪酸的量减少了,而相应不饱和脂肪酸尤其是油酸的含量增加了,这是我们在获得类可可脂时不想看到的。

### 3 结论

本研究对具有产油脂潜力菌株 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母的培养条件和产油能力进行了初步考察,利用摇瓶批式发酵考察了葡萄糖初始浓度对 *Cryptococcus curvatus* O3 酵母产油发酵的影响,结果表明其可以在较宽的葡萄糖浓度范围内生长产油而不出现明显的底物抑制现象,这使分批补料培养成为可能。在以葡萄糖为唯一碳源条件下,通过调整碳氮比,油脂含量达细胞干重的 65.1%,说明该菌株是一株非常优秀的油脂产生菌。

*Cryptococcus curvatus* O3 酵母油脂脂肪酸组成分析表明,在限氮培养基 5 条件下可获得与天然可可脂熔点温度及脂肪酸组成非常相似的油脂成分,但在此条件下是很不经济的,因为葡萄糖到油脂转化的脂肪系数较低。因此,进一步优化培养条件,解决油脂高产条件与产类可可脂条件不一致的问题成为后续研究的关键。

### 参考文献

- [1] Ratledge C, James PW. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, **51**: 1–51.
- [2] 李永红, 刘 波, 赵宗保, 等. 圆红冬孢酵母菌发酵产油脂培养基及发酵条件的优化研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(4): 650–656.
- [3] 徐学兵. 油脂化学. 北京: 中国商业出版, 1993, pp. 327–330.
- [4] Ratledge C. Biochemistry, stoichiometry, substrate and economics. In: Moreton RS. *Single Cell Oil*. London: Longman, 1988, pp.33–70.
- [5] Mainul Hassan, Philippe J Blanc, Louis-Marie Granger, *et al*. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum curvatum* grown in single-stage continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **40**: 483–488.
- [6] Evans CT, Ratledge C. A comparison of the oleaginous yeast, *Candida curvata*, grown on different carbon sources in continuous and batch culture. *Lipid*, 1983, **18**: 623–629.
- [7] Gill CO, Hall MJ, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture. *Appl Environ Microbiol*, 1977, **33**(2): 231–239.
- [8] Evans CT, Ratledge C. Influence of nitrogen metabolism on lipid accumulation by *Rhodospiridium toruloides* CBS 14. *J Gen Microbiol*, 1984, **130**: 1705–1710.
- [9] Davies RJ. Yeast oil from cheese whey process development. In: Moreton RS. *Single Cell Oil*. London: Longman, 1988, pp.99–145.