

斯达氏油脂酵母高产油发酵培养条件的优化

吴开云¹, 耿青伟², 李纪元¹, 范正琪¹, 陈东亮¹

(1 中国林业科学研究院 亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2 南京林业大学 森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

[摘要] 【目的】通过摇瓶发酵,对斯达氏油脂酵母的产油发酵条件进行优化。【方法】利用单因素试验,确定最佳碳源、氮源、初始 pH 值、无机盐的质量浓度;利用 4 因素 3 水平正交试验,优化碳源质量浓度、氮源质量浓度、接种量、培养温度等参数;同时考察发酵时间对斯达氏油脂酵母生长及油脂产量的影响。【结果】单因素试验结果表明,以葡萄糖为碳源时,斯达氏油脂酵母发酵生物量及油脂产量明显高于其他碳源;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,则生物量、油脂产量均最高;最佳初始 pH 值为 6.0~6.5;无机盐离子的最适添加质量浓度为: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L。碳源质量浓度、氮源质量浓度、接种量、培养温度 4 因素 3 水平正交试验的极差分析结果表明,培养温度对斯达氏油脂酵母的生物量和油脂产量的影响最大。斯达氏油脂酵母发酵培养基的最优组合为:葡萄糖 90 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/L, 接种量 10%, 培养温度 28 °C。在摇瓶发酵过程中,发酵培养 144 h 时菌体生物量、油脂产量均最高, OD_{600} 值也较高。【结论】在优化条件下对斯达氏油脂酵母进行摇瓶发酵,获得的菌体生物量最高可达 16.35 g/L,较优化前提高了 25.19%;油脂产量为 4.94 g/L,较优化前提高了 97.84%;菌体含油率最高可达 302.1 g/kg。

[关键词] 斯达氏酵母;油脂酵母;发酵;摇瓶;培养基优化

[中图分类号] Q93-3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)02-0150-07

Optimization of fermentation conditions of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for fatty produce

WU Kai-yun¹, GENG Qing-wei², LI Ji-yuan¹,
FAN Zheng-qi¹, CHEN Dong-liang¹

(1 Research Institute of Subtropical Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Fuyang, Zhejiang 311400, China;

2 College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

Abstract: 【Objective】Single factor experiments and orthogonal design experiments were carried out to optimize fermentation conditions of oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* for fatty produce. 【Method】In shaking-flask means of incubation, the fermentation of *L. starkeyi* was tested in different culture condition optimization by single factor experiment and orthogonal design of carbon source, nitrogen source, seed inoculum rate and temperature. 【Result】The results showed that mass yield and fatty rate were obviously higher by glucose than by other carbon source; also the mass yield was the highest when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used as nitrogen sources; meanwhile optimal initial pH was at 6.0—6.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L. Throughout the orthogonal experiments of glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, seed inoculum rate and temperature, the optimal culture condition was found as follows: glucose 90 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/L, seed inoculum rate about 10%, the incubating temperature equals 28 °C. According to OD_{600} of cultured liquid, the incubating time was 144 h when mass yield grew up to the maximum. 【Conclusion】Under the optimum culture condition, the biomass yield was 16.35 g/L, 25.19% higher than that with unoptimized condition, while the lipid content was 4.94 g/L, 97.84% higher against unoptimization, and the highest lipidic content

* [收稿日期] 2010-07-04

[基金项目] 浙江省科技厅重大项目(2006C12030)

[作者简介] 吴开云(1963—),男,江苏江都人,副研究员,博士,主要从事林木生物技术研究。E-mail: wukaiyun@yahoo.com

was 302.1 g/kg of the biomass.

Key words: *Lipomyces starkeyi*; oleaginous yeast; fermentation; flask-shaking; culture optimization

随着石油贮量的日益减少,全球范围能源供应形势日趋严峻。由于化石能源与生物能源的市场存在联动现象,石油能源价格上的上涨甚至带动了世界范围粮价的上涨^[1]。利用可再生资源生产能源化工产品,已成为社会经济可持续发展的迫切要求。

微生物油脂作为一种新型油脂深受人们关注,经过科技工作者对微生物油脂的不断探索,其研究已具有了相当规模^[2]。由于以前微生物油脂常用昂贵的培养基生产,成本比动植物油脂高,所以对微生物油脂的研究主要局限在获取功能性油脂方面,如富含多不饱和脂肪酸油脂^[3]。近年来,由于石油的过量开采及其贮量有限,并且动植物油脂的供应能力也有限,因此通过微生物发酵方法,将农副产品及其废弃物等碳水化合物转化为油脂的研究,已成为当今科学技术研究的热门课题^[4]。因产油微生物具有资源丰富、油脂含量高、碳源利用谱广等特点,开发潜力大,所以微生物油脂具有良好的发展前景,可能在未来生物柴油产业中发挥着重要的作用^[5]。

不同种属的微生物,其油脂含量、油脂成分各不相同;即使同一种微生物,在不同的培养条件下,其产油量和油脂成分也不尽相同^[6-8]。产油酵母的细胞内含有大量的甘油三酯,其脂肪酸组成与植物来源的食用油脂相似^[9]。通过前期对多株产油酵母的初步试验,斯达氏油脂酵母表现出较高的产油潜力。因此,本研究以斯达氏油脂酵母为供试菌株,在摇瓶培养条件下,通过单因素试验与正交试验,研究碳源、氮源及其质量浓度、接种量、初始 pH 值和无机盐质量浓度等对菌株生物量及油脂产量的影响,以期为斯达氏油脂酵母的工业化应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株为斯达氏油脂酵母(*Lipomyces starkeyi*),由中国科学院微生物研究所菌种保藏中心提供。

1.2 菌株培养

首先活化菌种,用无菌接种针挑取 4 ℃ 密封冷藏的斯达氏油脂酵母菌体,接种于 PDA 斜面培养基,28 ℃ 培养 48 h。再利用活化的菌种进行种子液培养,即利用接种环挑取活化的菌体接种于 20 mL YEPD 液体种子培养基(葡萄糖 20 g/L,酵母粉 10

g/L,蛋白胨 10 g/L,pH 6.0),28 ℃、160 r/min 摇床培养。然后利用种子液开始进行发酵培养,即按照 $V(\text{种子液}):V(\text{限氮发酵培养基})=1:10$ 的比例将种子液接种至限氮发酵培养基(葡萄糖 80 g/L,(NH₄)₂SO₄ 3.0 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L,KH₂PO₄ 2.0 g/L,pH 6.0,118 ℃ 灭菌 25 min),于 28 ℃、160 r/min 摇床培养 7 d。

1.3 斯达氏油脂酵母种子液培养时间的确定

分别在斯达氏油脂酵母培养 0,12,24,36,48,60,72,84,96 和 108 h 时,通过可见分光光度计测定种子液在 600 nm 处的吸光度(OD_{600}),以确定用于发酵培养的最佳接种时间。

1.4 影响斯达氏油脂酵母发酵产油脂的单因素试验

1.4.1 碳 源 分别选取 80 g/L 乳糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖 4 种碳源,作为斯达氏油脂酵母发酵培养基的添加碳源,通过测定生物量和油脂含量,考察不同碳源对其发酵产脂的影响。

1.4.2 氮 源 按照含氮量大致相等的原则,选取尿素(1.4 g/L)、蛋白胨(30 g/L)、酵母粉(8 g/L)、(NH₄)₂SO₄(3 g/L)、NH₄NO₃(1.8 g/L) 5 种氮源,作为斯达氏油脂酵母发酵培养基的添加氮源,通过测定生物量和油脂含量,考察不同氮源对其发酵产脂的影响。

1.4.3 初始 pH 值 本试验分别以 pH 值 4.5,5.0,5.5,6.0,6.5 和 7.0,作为发酵培养基的初始 pH 值,以确定斯达氏油脂酵母发酵培养基的最佳 pH 值。

1.4.4 MgSO₄·7H₂O 质量浓度 试验过程中 MgSO₄·7H₂O 添加质量浓度分别设为 0,0.5,1.0,1.5 和 2.0 g/L,以考察镁离子对斯达氏油脂酵母产油脂的影响,确定 MgSO₄·7H₂O 最佳质量浓度。

1.4.5 KH₂PO₄ 质量浓度 试验设计 KH₂PO₄ 的添加质量浓度分别为 0,1.0,2.0,3.0 和 4.0 g/L,以确定 KH₂PO₄ 的最佳质量浓度。

1.5 影响斯达氏油脂酵母发酵产油脂的多因素正交试验

在单因素试验结果的基础上,以油脂产量和生物量为指标,采用 L₉(3⁴) 正交表,选定葡萄糖质量浓度、(NH₄)₂SO₄ 质量浓度、接种量(体积分数)、培养温度 4 个主要因素进行 4 因素 3 水平正交试验,

试验因素及其水平详见表 1。

表 1 斯达氏油脂酵母产油脂 $L_9(3^4)$

正交试验的因素及水平

Table 1 Factors and levels in $L_9(3^4)$ orthogonal design for optimizing fermentation conditions of *L. starkeyi*

水平 Level	葡萄糖/ ($g \cdot L^{-1}$) Glucose A	$(NH_4)_2SO_4$ / ($g \cdot L^{-1}$) B	接种量/% Rate of inoculation C	培养温度/ $^{\circ}C$ Temperature D
1	50	1.5	5	25
2	70	2.5	10	28
3	90	3.5	15	31

1.6 发酵时间对斯达氏油脂酵母生长及油脂积累的影响

在斯达氏油脂酵母发酵培养过程(0~192 h)中,每隔 24 h 测定 1 次 OD_{600} ,并于培养 24 h 起每 24 h 测定 1 次生物量及油脂产量。

1.7 测定指标及其方法

1.7.1 菌体生物量的测定 将发酵液于 6 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,60 $^{\circ}C$ 烘干至恒质量后测定生物量^[10]。

$$\text{生物量} = \frac{\text{菌体干质量}(g)}{\text{发酵液体积}(L)}。$$

1.7.2 菌体油脂提取及油脂产量的测定 利用酸热法提取油脂^[11]。将发酵液于 6 000 r/min 离心 5 min,菌体沉淀按每 g 菌 6 mL 的比例加入 4 mol/L 盐酸,振荡混匀,室温放置 30 min 后,沸水浴 5 min, -20 $^{\circ}C$ 速冷,加入 2 倍体积氯仿-甲醇(V(氯仿):V(甲醇)=1:1) 提取液,充分振荡后,6 000 r/min 离心 5 min,取氯仿层,加入等体积 1 g/L 氯化钠溶液,混匀,6 000 r/min 离心 5 min,取氯仿层,100 r/min,55 $^{\circ}C$ 真空旋转蒸发,除去氯仿即得油脂。根据所得油脂质量和发酵液体积计算油脂产量。

$$\text{油脂产量} = \frac{\text{油脂质量}(g)}{\text{发酵液体积}(L)}。$$

1.7.3 脂肪系数的计算 脂肪系数是指每 100 g 糖转化为油脂的质量(g),根据培养基碳源浓度和发酵后油脂产量计算。

$$\text{脂肪系数} = \frac{100 \times \text{油脂质量}(g)}{\text{碳源质量浓度}(g/L) \times \text{发酵液体积}(L)}。$$

1.7.4 菌体油脂含量的测定 根据菌株发酵的生物量(干质量)和菌株所产油脂质量计算菌体油脂含量。

$$\text{菌体油脂含量} = \frac{\text{油脂质量}(g)}{\text{菌体生物量}(kg)}$$

1.7.5 菌体脂肪颗粒染色 采用苏丹黑染色法^[12],即将培养好的菌体按常规方法涂片,热固定,

用苏丹黑 B 染色 15 min,倾去染料,二甲苯脱色至载玻片透明,自然干燥后用显微镜观察,脂肪粒呈蓝黑色。

1.8 数据处理

数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 斯达氏油脂酵母种子液培养时间的确定

选择最佳接种时间可以保证种子液的浓度和活性。图 1 显示,种子液培养的 0~48 h 为迟缓期,斯达氏油脂酵母生长速度缓慢;48 h 后进入对数生长期,种子液 OD_{600} 值明显增大;84 h 以后进入稳定期,种子液 OD_{600} 值不再增加。在对数生长期内,微生物细胞处于生长和分裂的高峰期,且活性高,因此本试验选取摇瓶培养 60~72 h 的种子液用于接种发酵培养。

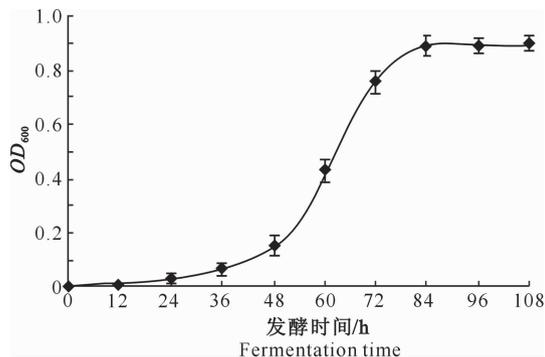


图 1 斯达氏油脂酵母的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *L. starkeyi*

2.2 影响斯达氏油脂酵母发酵产油脂的单因素试验结果

2.2.1 碳源 不同菌种对不同碳源的利用能力和利用速度有差异。不同碳源对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响见表 2。

表 2 不同碳源对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响

Table 2 Effect of carbon sources on fatty produce in fermentation of *L. starkeyi*

碳源 Carbon source	生物量/ ($g \cdot L^{-1}$) Biomass	油脂产量/ ($g \cdot L^{-1}$) Fatty yield	脂肪系数 Fatty coefficient	油脂含量/ ($g \cdot kg^{-1}$) Fatty rate
乳糖 Lactose	15.05	1.03	3.46	85.98
葡萄糖 Glucose	130.41	25.27	54.14	191.08
蔗糖 Sucrose	113.17	20.14	42.40	117.51
麦芽糖 Maltose	108.49	18.24	34.55	166.34

表 2 表明,当以葡萄糖作为碳源时,斯达氏油脂酵母对糖的利用率最高,菌体生物量及油脂产量均明显高于其他碳源;其次为蔗糖和麦芽糖;而以乳糖

作为碳源时,菌体生物量和油脂产量则均明显低于其他碳源,糖的利用率最差。

2.2.2 氮源 表 3 表明,无机氮源更有利于斯达氏油脂酵母生物量及油脂的积累,其中以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,斯达氏油脂酵母的生物量明显高于其他氮源,其次是 NH_4NO_3 和尿素;油脂产量和脂肪系数同样在以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时最高,其次是 NH_4NO_3 和酵母粉;以蛋白胨为氮源时,斯达氏油脂酵母的生物量、油脂产量和脂肪系数则明显低于其他氮源。

表 3 不同氮源对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响

Table 3 Effect of nitrogen sources on fatty produce in fermentation of *L. starkeyi*

氮源 Nitrogen source	生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield	脂肪系数 Fatty coefficient	油脂含量/ (g · kg ⁻¹) Fatty rate
尿素 Urea	116.67	11.35	28.40	94.24
蛋白胨 Peptone	63.18	9.14	19.36	139.95
酵母粉 Yeast powder	100.07	14.48	32.72	141.30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	130.61	25.23	53.09	190.65
NH_4NO_3	123.14	18.32	37.03	148.08

2.2.3 初始 pH 值 发酵培养基的初始 pH 值可影响微生物的生长及油脂的积累。表 4 表明,初始 pH 值为 4.5~6.0 时,随着 pH 值的升高,斯达氏油脂酵母的生物量和油脂产量均呈上升的趋势;pH 值为 6.0~6.5 时,菌株均可得到较高的生物量和油脂产量,但差异均不明显;pH 为 6.5~7.0 时,随着 pH 值的升高,生物量和油脂产量又呈下降趋势。因此,确定发酵培养基的初始 pH 值以 6.0~6.5 为宜。

表 4 初始 pH 值对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响

Table 4 Effect of pH on fatty produce in fermentation of *L. starkeyi*

pH	生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield	脂肪系数 Fatty coefficient	油脂含量/ (g · kg ⁻¹) Fatty rate
4.5	113.38	20.41	47.75	89.43
5.0	123.21	22.18	48.85	114.82
5.5	130.81	25.05	53.56	156.23
6.0	133.71	26.28	55.36	179.83
6.5	134.30	26.25	56.49	178.51
7.0	130.79	24.53	51.77	135.94

2.2.4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度 表 5 表明,未添加镁离子的培养基中,斯达氏油脂酵母的生物量及油脂产量均低于添加镁离子的培养基,而不同质量浓度 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对斯达氏油脂酵母的油脂产量影响并不明显。随着 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度的增大,生物量和油脂产量逐渐增加,当 $\text{MgSO}_4 \cdot$

$7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度为 1.5 g/L 时,生物量、油脂产量、脂肪系数、油脂含量均最大。因此,本试验中 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加质量浓度以 1.5 g/L 为宜。

表 5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响

Table 5 Effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on fatty produce in fermentation of *L. starkeyi*

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/$ (g · L ⁻¹)	生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield	脂肪系数 Fatty coefficient	油脂含量/ (g · kg ⁻¹) Fatty rate
0	124.65	19.91	47.76	167.16
0.5	128.17	25.40	55.18	197.37
1.0	132.10	25.57	56.13	192.10
1.5	139.56	27.84	58.67	200.11
2.0	131.07	25.38	54.22	193.86

2.2.5 KH_2PO_4 质量浓度 KH_2PO_4 可以为菌株生长提供大量的钾元素和磷元素;由于发酵过程中菌体会产生大量的有机酸,影响菌体的生长和油脂积累, KH_2PO_4 还可以作为缓冲剂调节发酵液的 pH 值。表 6 显示,随着 KH_2PO_4 质量浓度的增加,菌株的生物量和油脂产量逐渐提高,当 KH_2PO_4 质量浓度为 3.0 g/L 时,可获得最高的生物量和油脂产量,脂肪系数、油脂含量也最大;当 KH_2PO_4 质量浓度为 4.0 g/L 时,斯达氏油脂酵母的各项指标均有所降低。因此,本试验选择 KH_2PO_4 的最佳添加质量浓度为 3.0 g/L。

表 6 KH_2PO_4 质量浓度对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响

Table 6 Effect of KH_2PO_4 on fatty produce in fermentation of *L. starkeyi*

$\text{KH}_2\text{PO}_4/$ (g · L ⁻¹)	生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield	脂肪系数 Fatty coefficient	油脂含量/ (g · kg ⁻¹) Fatty rate
0	121.67	21.04	45.71	173.10
1.0	125.77	22.44	47.11	179.31
2.0	130.75	25.09	53.03	191.26
3.0	139.04	26.54	58.96	191.46
4.0	132.59	24.32	50.76	182.87

2.3 影响斯达氏油脂酵母发酵产油脂的多因素正交试验结果

正交试验结果(表 7)表明,葡萄糖质量浓度、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度、接种量及培养温度对斯达氏油脂酵母的生物量及油脂产量均有明显影响。对试验数据进行极差分析,由 R 值可知,4 因素对斯达氏油脂酵母生物量的影响程度依次为 D>C>A>B,即培养温度>接种量>葡萄糖质量浓度> $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度;4 因素对斯达氏油脂酵母油脂产量的影响程度依次为 D>C>B>A,即培养温

度 > 接种量 > $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度 > 葡萄糖质量浓度。以生物量为考察指标时, 发酵培养基的最优水平组合为 A3B3C3D2; 以油脂产量为考察指标时, 发酵培养基的最优水平组合为 A3B3C2D2。综合考

虑各因素, 为保证斯达氏油脂酵母的油脂产量, 发酵试验选用 A3B3C2D2 作为最优组合, 即葡萄糖 90 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/L, 接种量 10%, 培养温度 28 ℃。

表 7 影响斯达氏油脂酵母产油脂的多因素 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 7 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal design of *L. starkeyi*

指标 Index	试验 编号 No.	因素 Factors				生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield
		葡萄糖/ (g · L ⁻¹) Glucose A	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / (g · L ⁻¹) B	接种量/% Rate of inoculation C	培养温度/℃ Temperature D		
	1	1(50)	1(1.5)	1(5)	1(25)	8.259	2.512
	2	1(50)	2(2.5)	2(10)	2(28)	11.319	4.069
	3	1(50)	3(3.5)	3(15)	3(31)	8.663	1.891
	4	2(70)	1(1.5)	2(10)	3(31)	7.047	1.809
	5	2(70)	2(2.5)	3(15)	1(25)	14.670	2.365
	6	2(70)	3(3.5)	1(5)	2(28)	10.480	3.662
	7	3(90)	1(1.5)	3(15)	2(28)	17.332	3.298
	8	3(90)	2(2.5)	1(5)	3(31)	6.469	1.138
	9	3(90)	3(3.5)	2(10)	1(25)	15.943	4.244
生物量 Biomass	K_1	28.240	32.638	25.208	38.871		
	K_2	32.197	32.457	34.309	39.131		
	K_3	39.743	35.086	40.665	22.176		
	\bar{K}_1	9.413	10.879	8.403	12.957		
	\bar{K}_2	10.732	10.819	11.436	13.044		
	\bar{K}_3	13.248	11.695	13.555	7.392		
	R	3.835	0.876	5.152	5.652		
油脂产量 Fatty yield	K_1	8.472	7.619	7.312	9.121		
	K_2	7.836	7.572	10.122	11.029		
	K_3	8.680	9.797	7.554	4.838		
	\bar{K}_1	2.824	2.540	2.437	3.040		
	\bar{K}_2	2.612	2.524	3.374	3.676		
	\bar{K}_3	2.893	3.266	2.518	1.613		
	R	0.281	0.742	0.937	2.063		

正交试验中虽未求得葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度的上限, 但在最优组合下进行发酵产脂培养, 可获得的生物量为 16.35 g/L, 油脂产量为 4.94 g/L, 油脂含量可达 302.1 g/kg, 发酵后期仍有部分葡萄糖剩余, 提高葡萄糖的质量浓度并不能有效提高油脂的转化率, 因此试验中添加 90 g/L 的葡萄糖已经足够。

2.4 发酵时间对斯达氏油脂酵母生长及油脂积累的影响

表 8 表明, 发酵培养基中斯达氏油脂酵母在短时间内即可进入对数生长期, 发酵液 OD_{600} 值在培养 144 h 较高, 之后随着培养时间的延长 OD_{600} 值不再增加。斯达氏油脂酵母油脂的积累与菌体的生长一致, 生物量在发酵培养 24 h 即迅速增加, 144 h 达最大值; 油脂产量则在培养的前 48 h 内增长缓慢, 后期油脂的积累速度加快, 144 h 时油脂产量最大, 之后由于碳源基本耗尽, 开始利用积累的油脂维持

代谢, 致使生物量和油脂产量略有下降。因此, 菌株的培养时间以 144 h 为宜。

表 8 发酵时间对斯达氏油脂酵母生长及油脂产量的影响

Table 8 Effect of time on growth and fatty yield in fermentation of *L. starkeyi*

发酵时间/h Fermentation time	生物量/ (g · L ⁻¹) Biomass	油脂产量/ (g · L ⁻¹) Fatty yield	OD_{600}
0	—	—	0.69
24	1.43	0.04	2.29
48	3.51	0.57	5.62
72	6.47	1.37	9.30
96	10.50	2.85	12.39
120	15.42	3.44	13.42
144	16.46	4.93	14.68
168	16.11	4.82	14.80
192	16.11	4.71	14.80

斯达氏油脂酵母发酵培养 120 h 时菌体形态及脂肪颗粒的染色结果见图 2。由图 2 可见, 培养 120 h 时, 斯达氏油脂酵母菌体细胞内已经有大量的油

脂积累。

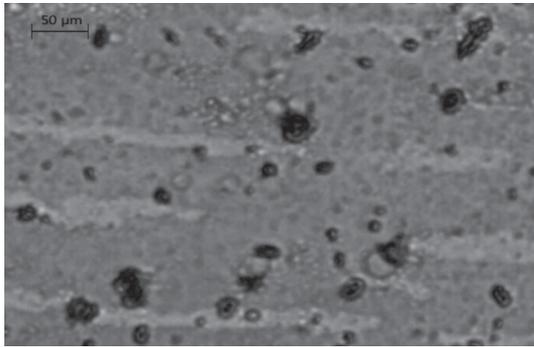


图 2 斯达氏油脂酵母发酵培养 120 h 时的菌体形态及脂肪颗粒($\times 200$)

Fig. 2 Mycelia morphology after fermentation 120 h of *L. starkeyi*($\times 200$)

3 结论与讨论

本试验通过单因素试验及正交试验,考察了不同因素对斯达氏油脂酵母发酵产油脂的影响,对发酵条件及培养基成分进行了优化,结果表明,最佳的碳源和氮源分别为葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,最佳发酵条件参数为:葡萄糖 90 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5 g/L,接种量 10%,无机盐离子的最适添加质量浓度为 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 3.0 g/L,培养温度 28 $^\circ\text{C}$,培养基最适初始 pH 值为 6.0~6.5。在此优化条件下培养 144 h,斯达氏油脂酵母的生物量较优化前提高了 25.19%,油脂产量提高了 97.84%,油脂含量最高可达 302.1 g/kg。

目前,制约利用微生物发酵产油脂的关键问题在于发酵成本较高,工业化难度较大,因此筛选获得廉价的高糖培养基显得尤为重要。本试验结果表明,斯达氏油脂酵母可以很好地利用葡萄糖合成油脂,而对二糖的利用率不高,特别是对于乳糖的利用率很低,菌体内只有少量油脂积累。有研究表明,斯达氏油脂酵母突变菌株可以有效利用葡萄糖-木糖混合物发酵产生油脂^[13]。由于自然界存在丰富的木质纤维素,其可以水解得到六碳糖和五碳糖,其中分别以葡萄糖和木糖为主,因此木质纤维素是潜在的重要生物转化原料。而斯达氏油脂酵母及其他一些能利用多种碳源的微生物,则可能是将来在利用木质纤维素生产油脂方面具有巨大潜力的菌株^[14-15]。

发酵培养基中的氮源主要用于菌体生长,当氮源耗尽后,菌株基本不再生长,而主要利用碳源合成油脂。本试验结果表明,斯达氏油脂酵母以无机氮

作为氮源时可以更好地生长并合成油脂。斯达氏油脂酵母的发酵过程中同样需要无机盐离子的参与,适当添加无机盐离子可以提高油脂产量,但添加无机盐离子并不是越多越好。微量元素对斯达氏油脂酵母发酵的影响尚需进一步研究。

本研究的正交试验表明,斯达氏油脂酵母发酵的葡萄糖质量浓度以 90 g/L 为宜,如果葡萄糖质量浓度过高,可能会导致培养基中渗透压过高而抑制菌株的生长,同时也会有大量的糖残余,不利于葡萄糖的有效利用,因此选择合适的碳氮比尤为重要。

本研究选用的斯达氏油脂酵母菌株为野生菌株,最终发酵所得油脂产量尚不理想,因此需要对该菌株作进一步诱变筛选,以期获得更高的油脂产量。

[参考文献]

- [1] Javier B. IMF warns of threat to poorer nations [EB/OL]. 2008-07-02. http://relooney.fatcow.com/0_New_3413.pdf.
- [2] 董文宾,梁西爱,代春吉,等. 微生物油脂及其新的应用研究 [J]. 粮油加工与食品机械,2006(3):54-55.
Dong W B, Liang X A, Dai C J, et al. Microbial oils and their exploitation and utilization [J]. Cereals and Oils Processing, 2006(3):54-55. (in Chinese)
- [3] 刘波,孙艳,刘永红,等. 产油微生物油脂生物合成与代谢调控研究进展 [J]. 微生物学报,2005,45(1):153-156.
Liu B, Sun Y, Liu Y H, et al. Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(1): 153-156. (in Chinese)
- [4] 罗玉萍,杨荣英,陈英,等. 酵母油脂的脂肪酸组成的研究 [J]. 中国粮油学报,1994,3(9):44-48.
Luo Y P, Yang R Y, Chen Y, et al. The fatty acid composition and proportion of oils and fats produced by four yeast strains [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 1994, 3(9):44-48. (in Chinese)
- [5] 易绍金,郑义平. 产油微生物的研究及应用 [J]. 中外能源,2006,2(11):90-94.
Yi S J, Zheng Y P. Research and application of oleaginous microorganism [J]. China Foreign Energy, 2006, 2(11): 90-94. (in Chinese)
- [6] 刘吉华,袁生,戴传超. 影响真菌发酵过程中多不饱和脂肪酸积累的条件 [J]. 微生物学杂志,1997,17(4):52-55.
Liu J H, Yuan S, Dai C C. Study on conditions influencing accumulation of polyunsaturated fatty acid in fungus fermentation [J]. Journal of Microbiology, 1997, 17(4):52-55. (in Chinese)
- [7] 吴克刚,杨连生. 利用海生真菌发酵生产 DHA 的研究概况 [J]. 海洋科学,2000,24(7):19-21.
Wu K G, Yang L S. Review on the production of docosahexaenoic acid by marine fungi [J]. Marine Sciences, 2000, 24(7):

- 19-21. (in Chinese)
- [8] 徐华顺,罗玉萍,李思光. 产棕榈油酸酵母发酵条件的研究 [J]. 中国油脂, 1999, 24(6): 53-55.
Xu H S, Luo Y P, Li S G. Study on the ferment conditions with palmitic acid yeast [J]. China Oils and Fats, 1999, 24(6): 53-55. (in Chinese)
- [9] 王 萍. 微生物油脂生产和应用 [J]. 粮食与油脂, 1999(3): 49-51.
Wang P. The production and utilization of microbial oils [J]. Journal of Cereals & Oils, 1999(3): 49-51. (in Chinese)
- [10] 刘淑君,杨文博,施安辉. 高产油脂酵母选育及摇瓶发酵条件的研究 [J]. 微生物学通报, 2000, 27(2): 93-97.
Liu S J, Yang W B, Shi A H. Screening of the high lipid production strains and studies on its flask culture conditions [J]. Microbiology, 2000, 27(2): 93-97. (in Chinese)
- [11] 李植峰,张 玲,沈晓京,等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究 [J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 72-76.
Li Z F, Zhang L, Shen X J, et al. A comparative study on four method of fungi lipid extraction [J]. Microbiology, 2001, 28(6): 72-76. (in Chinese)
- [12] 郝 林. 食品微生物学实验技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 138-139.
Hao L. Laboratory methods in food microbiology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 138-139. (in Chinese)
- [13] 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 [J]. 生物加工过程, 2007, 5(2): 36-41.
Kong X L, Liu B, Zhao Z B, et al. Microbial production of lipids by cofermentation of glucose and xylose with *Lipomyces starkeyi* 2# [J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2007, 5(2): 36-41. (in Chinese)
- [14] 李永红,刘 波,孙 艳,等. 广谱碳源产油酵母菌的筛选 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(12): 39-44.
Li Y H, Liu B, Sun Y, et al. Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilating capacity [J]. China Biotechnology, 2005, 25(12): 39-44 (in Chinese)
- [15] 李 建,刘宏娟,张建安,等. 微生物油脂研究进展及展望 [J]. 现代化工, 2007, 27(2): 133-136
Li J, Liu H J, Zhang J A, et al. Progress in and prospect of microbial lipid production by fermentation [J]. Modern Chemical Industry, 2007, 27(2): 133-136. (in Chinese)

(上接第 149 页)

- [7] 国际种子检验协会. 1996 国际种子检验规程 [M]. 彦启传,邓光联,译. 北京: 中国农业出版社, 1999: 107-156.
International Seed Testing Association. International seed testing association 1996 [M]. Yan Q C, Deng G L, translated. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 107-156. (in Chinese)
- [8] 何天明,陈学森,张大海,等. 中国普通杏种质资源若干生物学性状的频度分布 [J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 17-22.
He T M, Chen X S, Zhang D H, et al. Frequency distribution of several biological characters in different apricot eco-geographical groups native to China [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2007, 34(1): 17-22. (in Chinese)
- [9] 张俊环,王玉柱,孙浩元,等. 杏树皮可溶性总蛋白的提取与浓缩方法探讨 [J]. 北方园艺, 2009(11): 51-53.
Zhang J H, Wang Y Z, Sun H Y, et al. Study on the extracting and condensing methods of total proteins from the shoot barks of apricot [J]. Northern Horticulture, 2009 (11): 51-53. (in Chinese)
- [10] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京: 科学出版社, 2002: 1713-1722.
Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 3rd ed. Huang P T, translated. Beijing: Science Press, 2002: 1713-1722. (in Chinese)
- [11] 何忠效. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 168-206.
He Z X. Experimental biotechnology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 168-206. (in Chinese)
- [12] 李丽锋,刘明国,李立新. 辽西地区山杏立地条件的主成分-数量化分析 [J]. 生物数学学报, 2008, 23(4): 687-694.
Li L F, Liu M G, Li L X. Study on the site condition of *Armeniaca sibirica* in western Liaoning Province based on quantitative-theory [J]. Journal of Biomathematics, 2008, 23(4): 687-694. (in Chinese)
- [13] 马玉花,赵 忠,李科友,等. 不同产地苦杏仁油的含量及成分分析 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(11): 70-73.
Ma Y H, Zhao Z, Li K Y, et al. Oil content and composition of almond from different producing area [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24 (11): 70-73. (in Chinese)
- [14] 刘明国,赵桂玲,董胜君. 山杏种内 POD 同工酶及种子可溶性蛋白分析 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4): 582-586.
Liu M G, Zhao G L, Dong S J. Analysis of peroxidase isoenzyme and seed soluble protein in *Armeniaca sibirica* [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2006, 37 (4): 582-586. (in Chinese)