

# 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 Optimized Culture Medium and Fermentation Conditions for Lipid Production by *Rhodosporidium toruloides*

李永红<sup>1</sup>, 刘 波<sup>2</sup>, 赵宗保<sup>2\*</sup>, 白凤武<sup>1,2</sup>

LI Yong-Hong<sup>1</sup>, LIU Bo<sup>2</sup>, ZHAO Zong-Bao<sup>2\*</sup> and BAI Feng-Wu<sup>1,2</sup>

1 大连理工大学生物科学与工程系, 大连 116023

2 中科院大连化学物理研究所生物技术部, 大连 116023

1 Department of Bioscience and Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116023, China

2 Laboratory of Biotechnology, Dalian Institute of Chemical Physics, CAS, Dalian 116023, China

**摘 要** 采用均匀设计和单因子试验法, 系统考察了圆红冬孢酵母菌 (*Rhodosporidium toruloides*) 在不同碳氮比条件下产油发酵情况以及添加无机盐对产油发酵的影响。通过均匀设计软件对二次多项回归方程求解及单因素分析得知在培养基组成成分分别为: 葡萄糖 70g/L, 硫酸铵 0.1g/L, 酵母粉 0.75g/L, 磷酸二氢钾 0.4g/L, 七水硫酸镁 1.5g/L, 初始 pH 6.0, 在灭菌 (121℃ 15min) 后添加 ZnSO<sub>4</sub> 1.91 × 10<sup>-6</sup> mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.50mmol/L, MnCl<sub>2</sub> 1.22 × 10<sup>-4</sup> mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1.00 × 10<sup>-4</sup> mmol/L。发酵摇瓶装液量为 250mL 三角瓶装培养基 50mL, 接种量为 10% (种龄 28h)。在上述条件下, 30℃ 振荡 (200r/min) 培养 120h, 所得菌体油脂含量高达 76.1%, 脂肪得率系数可达 22.7。

**关键词** 圆红冬孢酵母菌, 微生物油脂, 发酵条件优化, 均匀设计

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0650-07

**Abstract** Culture medium and fermentation conditions for lipid production by *Rhodosporidium toruloides* were optimized with single factor and uniform design experiment. The best medium recipe was found with 70g/L glucose, 0.1g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.75g/L yeast extract, 1.5g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, sterilized at 121°C for 15min, and then supplemented with ZnSO<sub>4</sub> 1.91 × 10<sup>-6</sup> mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.50mmol/L, MnCl<sub>2</sub> 1.22 × 10<sup>-4</sup> mmol/L and CuSO<sub>4</sub> 1.00 × 10<sup>-4</sup> mmol/L. The optimal fermentation conditions were as follows: 50mL of medium (pH 6.0) in 250mL Erlenmeyer flask with 10% inoculum (28h) under orbital shaking at 200r/min for 120h at 30°C. Under these conditions, yeast biomass accumulated lipids up to 76.1%.

**Key words** *Rhodosporidium toruloides*, microbial lipids, culture optimization, uniform design

自然界中存在少数微生物在适宜条件下能将碳水化合物、碳氢化合物转化为油脂而大量贮存, 菌体油脂含量最高可超过其干重的 70%<sup>[1]</sup>。已知细菌、酵母、霉菌、藻类中都有能积累油脂的菌株, 但以酵

母菌和霉菌类真核微生物居多<sup>[2]</sup>。利用微生物生产油脂周期短, 不受季节和气候的影响, 营养简单, 易于进行工业化大规模培养。近年来, 随着现代生物技术的发展, 已获得更多具有高产油能力或其油脂

Received: January 16, 2006; Accepted: April 11, 2006.

This work was supported by the grants from CAS "100 Talents" Program and National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2004CB719703).

\* Corresponding author. Tel: 86-411-843792011; E-mail: zhaozb@dicp.ac.cn

中国科学院“百人计划”启动经费、国家重点基础研究发展计划(973计划)(No. 2004CB719703) 所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

组成中富含稀有脂肪酸的产油微生物资源,提高了微生物产油的技术经济可行性<sup>[3-5]</sup>。同时,在油脂积累代谢调控的分子机制方面也取得了一些重要突破<sup>[6]</sup>。更重要的是,随着化石资源贮量日益减少导致能源供应日趋严峻,利用可再生资源,通过酶催化转化和微生物发酵来生产能源产品和化学品,部分替代化石资源,将是可持续发展的必然。因此,利用微生物生产油脂是开发新油脂资源的重要方向,进一步探索有关微生物积累油脂具有重要的现实意义<sup>[7]</sup>。本研究旨在通过均匀设计法和单因子试验来优化圆红冬孢酵母菌产油脂发酵的培养基组成和培养条件,为其进一步研究打下基础。

均匀设计法是我国数论统计学家方开泰和数学家王元结合数论与多元统计理论而建立起来的一种实验方法,对于多因素多水平试验条件的选择,可以大大减少试验次数,提高效率<sup>[8]</sup>。该方法在我国航天式导弹的研制中得到有效的应用,使设计周期大大缩短,并节约大量费用。目前在实验室系统中试验设计也得到了很好的应用<sup>[9]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

圆红冬孢酵母菌 *Rhodosporidium toruloides* AS 2.1389 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC),经在玉米秸秆稀酸水解液中反复5次培养后,分离和纯化得到本实验用菌株,暂定名为Y4#菌。该菌株能在较低pH值(小于2.0)下发酵,生物量和油脂含量稳定,较出发菌株高。

### 1.2 培养基及培养条件

**1.2.1 培养基:**YEPD培养基组成(g/L):葡萄糖20,酵母粉10,蛋白胨10,pH5.8~6.0作为种子培养基。斜面培养基在YEPD基础上加入琼脂粉15g。原始培养基组成(g/L):葡萄糖70,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2,酵母粉0.5,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.5,pH自然。均匀实验发酵培养基(g/L):按照实验设计表1、2配制,pH6.0。单因素实验发酵培养基(g/L):在均匀设计实验1得出的葡萄糖、硫酸铵和酵母粉组成中分别添加不同浓度的金属盐。发酵条件考察培养基(g/L)均匀设计实验2得出的优化培养基。以上培养基均在121℃下饱和蒸汽灭菌15min。

**1.2.2 培养方法:**将新鲜斜面上的Y4#菌接种于50mL液体种子培养基中,于30℃,200r/min摇床培养20h~24h。以10%接种量接种于50mL限氮发酵

培养基中,在相同条件下培养96h(除特别说明外)。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 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。

**1.3.2 菌体油脂的抽提:**湿菌体参照文献方法直接进行油脂抽提<sup>[10]</sup>,油脂含量为菌体油脂量占菌体生物量的百分数。

**1.3.3 残糖的测定:**采用山东省科学院生产的SBA-50B生物传感分析仪进行离线葡萄糖测定,检测的范围在0g/L~1.0g/L。

### 1.4 实验设计

**1.4.1 均匀设计1:**通过前期实验发现,Y4#菌产油发酵培养基中需要一定量的镁离子和无机磷,因此首先固定培养基中MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>的浓度分别为0.5g/L和1.0g/L。由于培养基的碳氮比对微生物的油脂合成的影响很大,一般选取葡萄糖为碳源和能源,硫酸铵为无机氮源,并添加适量酵母粉。故选取这三个因子作为研究对象,以油脂含量为响应值,进行试验。实验设计、数据分析及模型建立皆采用中国数学会均匀设计分会方开泰和杜明亮开发设计的均匀设计软件UD3.0来进行,由均匀设计软件给出设计方案设计各培养基配方见表1。

表1 均匀设计培养基组成

Table 1 Uniform design matrix of the medium composition

Trial No.	Glucose(g/L)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g/L)	Yeast extract(g/L)
1	70	1	0.15
2	75	0.8	0.6
3	80	3	0.05
4	85	0.2	0.35
5	90	0.1	0.75
6	95	0.5	0.5
7	100	2	0.4
8	105	0.3	0.1
9	110	1.5	0.7
10	115	0.7	0.3
11	120	2.5	0.65
12	125	0.4	0.45
13	130	0.9	0.2
14	135	3.5	0.25
15	140	0.6	0.55

**1.4.2 均匀设计2:**由均匀设计1实验结果和单因素实验结果(见本文结果与讨论部分)可知影响Y4#菌产油的关键因素是培养基中的碳氮比以及微量金属离子,但是在上面的实验中Y4#菌的生物量均不高,在10g/L左右。由于MgSO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>可提供四种需要量大的元素镁、硫、钾和磷,采用均匀设计实验,由均匀设计软件给出设计方案

设计各培养基配方如表 2。

表 2 均匀设计无机盐组成

Trial No.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( g/L)	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O( g/L)
1	0.5	0.5	0.3
2	1	1.5	0.45
3	1.5	2.5	0.25
4	2	0	0.4
5	2.5	1	0.2
6	3	2	0.35
7	3.5	3	0.5

1.4.3 单因素试验设计 在均匀设计实验 1 得出的培养基组成中分别添加不同浓度的金属盐。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养基碳氮比的确定

根据实验设计表 1 进行了 15 组实验,其结果见图 1。

图 1。

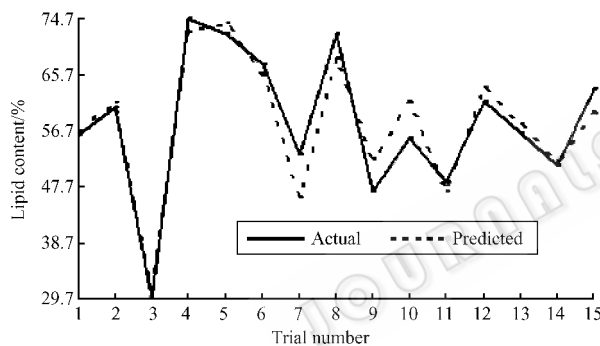


图 1 培养基组成均匀设计实验菌体油脂含量的实测值与预测值比较

Fig.1 Cellular lipid content variation of medium composition uniform design experiment

通过 UD3.0 软件,以油脂含量(为生物量和油脂量的综合指标)为考察对象,对均匀设计实验 1 数据进行最优回归子集回归拟合获得 Y4 # 对葡萄糖、硫酸铵的二元回归方程为:

$$Y = 83.83 - 37.54 X_2 - 0.0009 X_1^2 + 0.185 X_1 X_2 + 2.379 X_2^2$$

式中,  $Y$  为油脂含量的预测值,  $X_1$  和  $X_2$  分别为葡萄糖和硫酸铵的编码值。

从该方程的方差分析表 3 可见,该模型显著,预测值与实测值之间具有高度的相关性 ( $R = 0.957$ )。

上述方程的回归系数显著性检验表明:试验三因素中除了酵母粉外其他两因素对油脂合成的影响皆显著,葡萄糖与硫酸铵的交互作用影响显著。软

表 3 培养基组成均匀设计实验方差分析

Table 3 ANOVA for the regression equation of medium composition uniform design experiment

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value
Model	1775.5	4	443.9	27.1
Error	163.5	10	16.3	
Cor total	1939.1	14		

$R = 0.957$      $R^2 = 0.916$

件给出优化的发酵培养基基本成分为( g/L ):葡萄糖 70 硫酸铵 0.1 酵母粉 0.75,计算得 C/N 比(C/N 比是指在微生物培养基中所含的碳源中碳原子的摩尔数与氮源中氮原子的摩尔数之比,其中酵母粉中含有 12% (W/W) 的碳和 7% (W/W) 的氮)为 420。培养基中的碳氮比是影响油脂合成的重要因素,这是因为产油微生物合成油脂的前提是当培养基中的其他营养物质特别是氮源耗尽而碳源丰富的情况下,细胞不再增殖,多余的碳源被转化为油脂储存在体内。故初始的 C/N 比就显得尤为重要,Papanikolaou S. 等报道多限制因素对刺孢小克银汉霉和深黄被孢霉的培养中可以看到:当培养基的 C/N 比从 83.5 增加到 133.5 时,刺孢小克银汉霉的油脂含量从 36% 增加到了 47%;深黄被孢霉的油脂含量由原来的 50% 提高到了 56%<sup>[11]</sup>。同时 Papanikolaou S. 等利用深黄被孢霉在高糖培养基条件下固定培养基中的硫酸铵和酵母粉的浓度,发现改变葡萄糖初始浓度使培养基的 C/N 比从 150 变化到 340 时,随着 C/N 比的增大其单位时间内的油脂产率由 0.05g/(L·h) 提高到了 0.07g/(L·h)<sup>[12]</sup>。本文考察了不同碳氮比对 Y4 # 菌产油的影响,可以看到在 C/N 比为 315、571、593、694 时油脂含量分别达到 67.6%、72.4%、74.9%、72.5%,这说明油脂含量的变化趋势跟 C/N 比的变化趋势是一致的,且随着 C/N 比的增大其油脂含量也增大,但过高的 C/N 比也会影响其生长和油脂的生成(见图 2)。软件优化出来的结果经摇瓶试验验证,油脂含量达到 76%,优于前面的所有试验结果,此条件下的培养基组成为( g/L ):葡萄糖, 70 硫酸铵, 0.01 酵母粉, 0.75 七水硫酸镁, 0.5 磷酸二氢钾, 1, 最优 C/N 为 420。但在此优化条件下,菌体生物量在培养 120h 后才达到了 10.7g/L,油脂量也只有 8.1g/L,因此下面继续考察其他培养条件对 Y4 # 菌产油的影响。

### 2.2 微量二价金属离子对产油发酵的影响

考虑到 Y4 # 产油发酵过程菌体生长繁殖和代谢可能会需要某些微量金属元素的参与,对发酵培

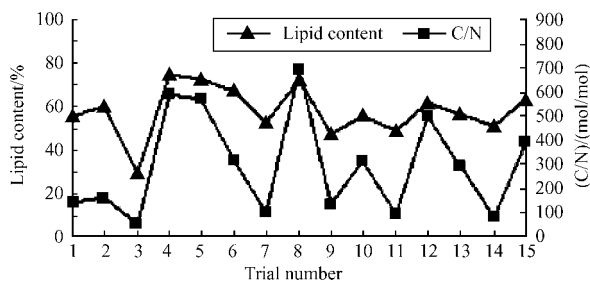


图2 C/N 比对菌体油脂含量的影响

Fig. 2 The effect of carbon-to-nitrogen ratio on cellular lipid content

培养基中添加了无机盐以促进油脂的生成。采用单因素方法分别考察了  $ZnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$  和  $CuSO_4$  等金属盐的添加量对 Y4 # 菌产油发酵的影响。

从图 3~6 可以看出:加入适当浓度的  $ZnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CuSO_4$  会促进油脂的积累,但浓度过高会使油脂的积累受到抑制。当  $ZnSO_4$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CuSO_4$  分别为  $1.91 \times 10^{-6}$  mmol/L、1.50mmol/L、 $1.22 \times 10^{-4}$  mmol/L、 $1.00 \times 10^{-4}$  mmol/L 时,发酵时间为 120h,其油脂含量分别达到相应的最大值,但是生物量均没有超过 16g/L。

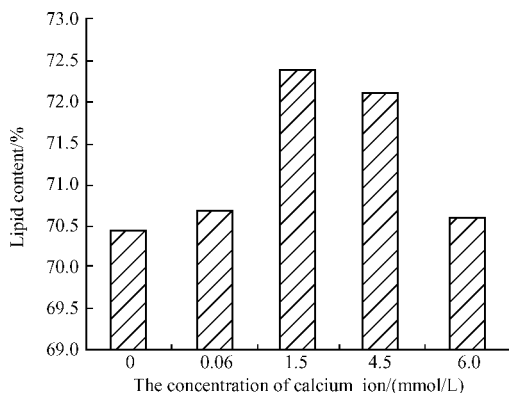


图4 氯化钙用量对菌体油脂含量的影响

Fig. 4 The effect of  $CaCl_2$  concentration on cellular lipid content

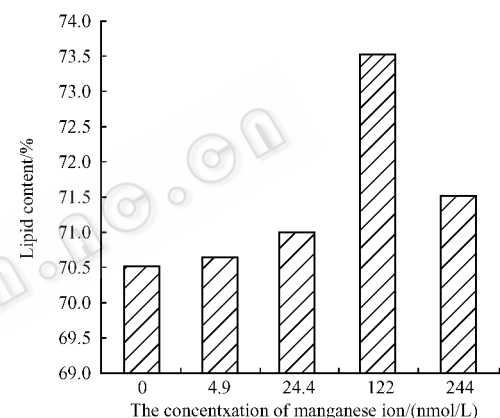


图5 氯化锰用量对菌体油脂含量的影响

Fig. 5 The effect of  $MnCl_2$  concentration on cellular lipid content

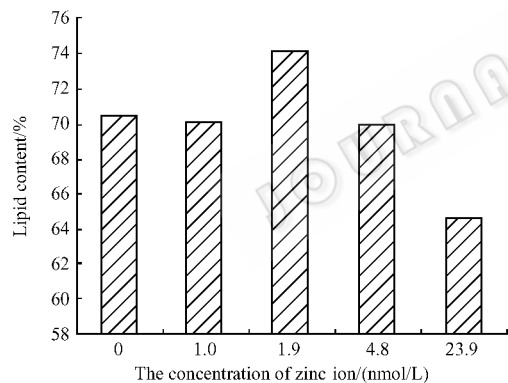


图3 硫酸锌用量对菌体油脂含量的影响

Fig. 3 The effect of  $ZnSO_4$  concentration on cellular lipid content

### 2.3 硫酸镁、磷酸二氢钾以及磷酸氢二钾的影响

根据实验设计表 2 进行了 7 组实验,其结果见图 7。

应用均匀设计软件对试验数据进行回归分析,得到均匀设计的回归方程如下: $Y = 71.14 + 1.74 X_1 - 0.78 X_1^2 - 2.00 X_1 X_3 - 0.049 X_2 X_3 + 16.19 X_3^2$ ,式中  $Y$  为油脂含量的预测值, $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_3$  分别为磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和七水硫酸镁的编码值。从该方程的方差分析表 4 可见,该模型非常显著,预测值与实测值之间具有高度的相关性 ( $R = 0.997$ )。

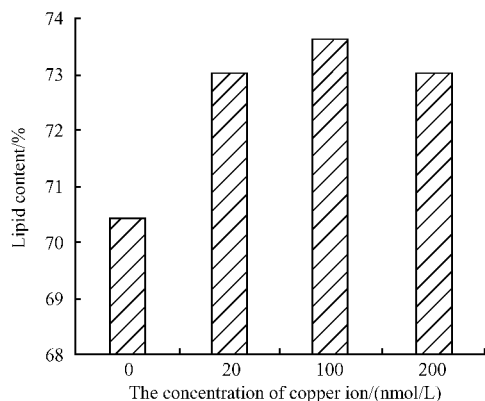


图6 硫酸铜用量对菌体油脂含量的影响

Fig. 6 The effect of  $CuSO_4$  concentration on cellular lipid content

上述方程的回归系数显著性检验表明:试验中三因素中对油脂合成的影响皆显著。软件给出最优解:磷酸二氢钾 0.1g/L、磷酸氢二钾 0g/L、七水硫酸镁 1.91g/L。中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

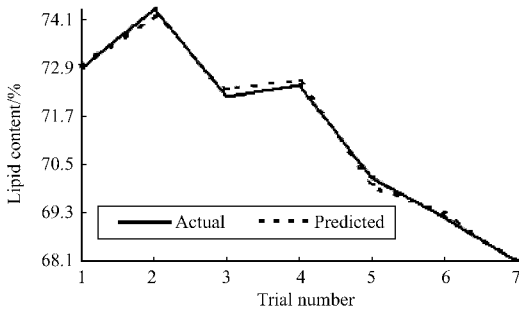


图7 无机盐组成均匀设计实验菌株油脂含量的实测值与预测值比较

Fig. 7 Cellular lipid content variation of inorganic salt composition uniform design experiment

表4 无机盐组成均匀设计实验方差分析

Table 4 ANOVA for the regression equation of inorganic salt composition uniform design experiment

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F value
Model	30.1	3	10	157.6
Error	0.19	3	0.06	
Cor total	30.3	6		
				$R = 0.997$ $R^2 = 0.994$

酸镁 1.5g/L。

由软件给出的曲线图(图8、图9)可以看出油脂含量随着磷酸二氢钾的减少而增大,在0.5g/L左右趋于平缓,而随着七水硫酸镁的增大而增大,故运用软件进行预测分析,并进行试验验证,结果如表5。

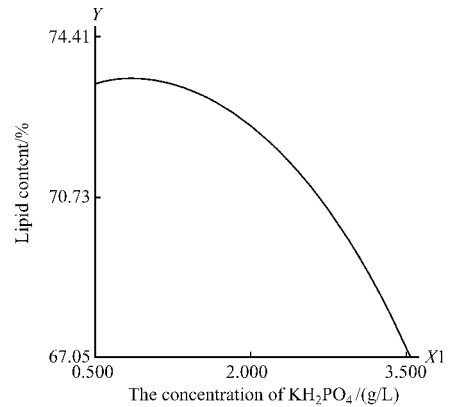


图8 磷酸二氢钾用量对菌株油脂含量的影响  
Fig. 8 The effect of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration on cellular lipid content

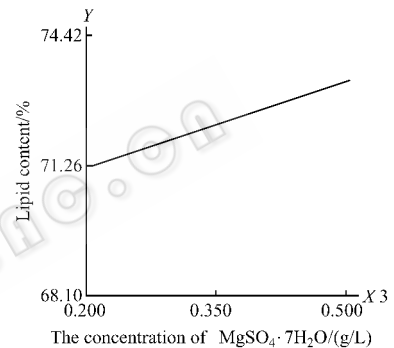


图9 硫酸镁用量对菌株油脂含量的影响  
Fig. 9 The effect of  $\text{MgSO}_4$  concentration on cellular lipid content

表5 均匀设计法预测值及验证实验数据比较

Table 5 Comparison of uniform design predicted value and experimental data

Trial No.	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ /(g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	Predicted result/%	Experiment result/%
1	0.5	0.5	75.3	74.2
2	0.5	1	87.0	74.8
3	0.1	1	87.3	75.2
4	0.4	1.5	106.9	76.4

由预测结果可知,当磷酸二氢钾的浓度在0.5g/L左右变化时,预测结果随七水硫酸镁的变化而变化,当其值增大到1.5g/L时,预测结果达到最大值。由以上验证结果分析,确定这三种无机盐的配方为(g/L):磷酸二氢钾,0.4;磷酸氢二钾,0;硫酸镁,1.5。在此条件下,生物量14.9g/L,油脂量11.4g/L。

## 2.4 发酵条件优化

**2.4.1 菌种龄对产油发酵的影响**:取1~2环新鲜斜面的Y4#菌接入种子摇瓶中,30℃,200r/min摇床分别培养12h、16h、20h、24h、28h、32h、36h和40h,再分别接种到发酵摇瓶,30℃培养120h,测定发酵终点菌体生物量、油脂产量和残糖。结果见图10。

由图10可以看出随着种子液生长时间的延长,菌体的油脂含量经历了一个由小至大并逐渐降低的过程,在这期间种子也经历了由延迟期到对数生长期再到稳定期并进入衰亡期。结果表明在种龄为28h时接种Y4#菌的油脂含量最高,达到了73%。

**2.4.2 供氧量对产油发酵的影响**:为了在摇瓶基础上考察供氧量对Y4#菌产油发酵的影响,设计试验在250mL三角瓶中分别装入25mL、50mL、75mL、100mL发酵培养基,30℃培养96h后测定菌体生物量、油脂产量和残糖。由图11可以看出在250mL三角瓶中装入25mL和50mL培养基时的结果相差不多,但是随着装液量的再增大其油脂含量急剧下

降,故选取装瓶量为 50mL/250mL。这说明产油酵母菌 Y4 # 在生长的过程耗氧量比较大。

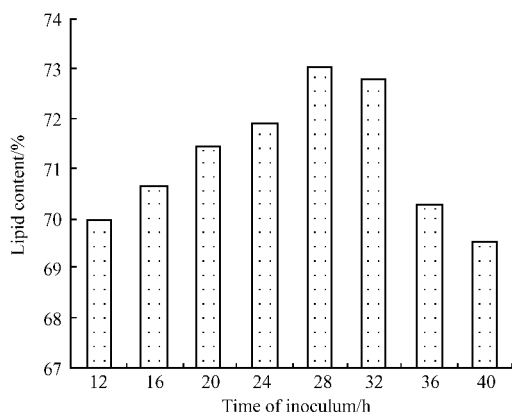


图 10 种龄对菌体油脂含量的影响

Fig. 10 The effect of inoculum's age on cellular lipid content

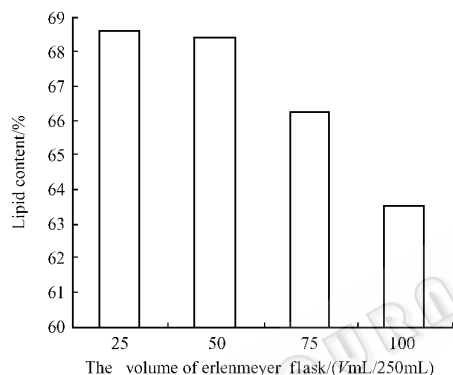


图 11 装液量对菌体油脂含量的影响

Fig. 11 The effect of culture volume on cellular lipid content

**2.4.3 初始 pH 值对产油发酵的影响** pH 值是影响微生物发酵的一个重要因素,本研究对培养基初始 pH 值进行了优化。将培养基、1mol/L 盐酸和 1mol/L 氢氧化钠分别灭菌后,调发酵培养基初始 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,30℃ 摇床培养 96h 后测定菌体生物量、油脂产量和残糖。

由图 12 可以看出 Y4 # 菌在经过两次均匀设计后的培养基中生长时,在 pH 3~10 的范围内菌体油脂含量和生物量比较稳定,这说明其可以在一个相当广泛的 pH 范围内生长和积累产物油脂,有利于今后利用木质纤维素水解液发酵生产油脂。但是初始 pH 在 6.0 时油脂量和油脂含量略高,故在以后的试验当中初始 pH 值均选取 6.0。

在以上优化过程中,每一步均对油脂发酵过程有一定的贡献(图 13)。通过对培养基组成优化,确

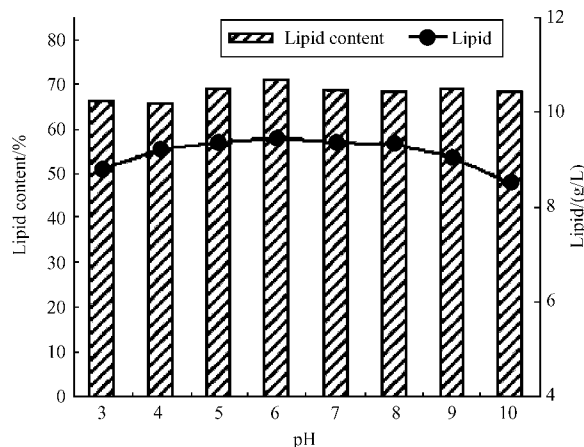


图 12 初始 pH 值对菌体油脂含量的影响

Fig. 12 The effect of initial pH on cellular lipid content

定了 C/N 的范围,大幅度提高了菌体油脂含量,由 42% 提高至 75.7%,几乎达到优化过程的最好值,油脂量提高了 1.7 倍,生物量提高了 50%,但是生物量仍然不高。这说明 C/N 比对 Y4 # 菌发酵产油具有很大的影响。在无机盐组成优化和单因子实验中,菌体油脂含量虽然没有得到显著变化,但生物量和油脂量均有不同程度的增加。

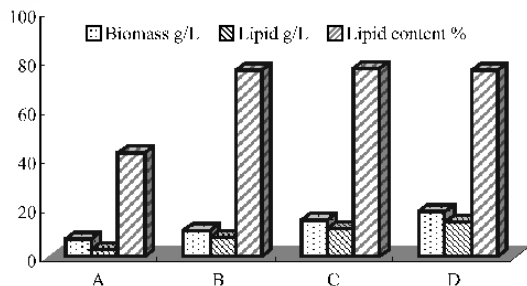


图 13 三次优化结果比较

Fig. 13 Comparison of microbial oil production under conditions of various optimizing stage

A: initial condition; B: culture medium optimized condition; C: organic salt optimized condition; D: single-factor optimized condition.

## 2.5 验证性试验

综合不同无机盐对 Y4 # 菌发酵产油的影响及均匀设计的结果,在发酵培养基基本成分中添加  $ZnSO_4$   $1.91 \times 10^{-6}$  mmol/L、 $CaCl_2$  1.50mmol/L、 $MnCl_2$   $1.22 \times 10^{-4}$  mmol/L、 $CuSO_4$   $1.00 \times 10^{-4}$  mmol/L 作为优化的培养基,将优化的培养基和培养条件与原培养基相比较,发酵终点分别测定生物量和油脂量以及培养基中的残糖,结果见表 6。

从试验结果可以看出,圆红冬孢酵母 Y4 # 菌经培养基和培养条件的优化,其生物量提高了 1.65 倍,油脂量提高了 3.79 倍,脂肪得率系数提高了 2.2 倍。

表6 优化前后产油发酵比较

Table 6 Comparison of microbial oil production under initial and optimized fermentation conditions

	Biomass/(g/L)	Lipid/(g/L)	Lipid content/%	Lipid coefficient (g/100g substrate utilized) %
Initial medium*	6.9	2.9	42.0	7.1
Optimum medium	18.3	13.9	76.1	22.7

\* Data was in "Screening of Oleaginous Yeasts for Broad-Spectrum Carbohydrates Assimilation Capacity"<sup>[13]</sup>.

倍。脂肪得率系数是评价产油微生物经济性的重要指标,脂肪得率系数越高,表明菌体对底物的利用效率越好。根据生物化学分析,理论上每100g葡萄糖可产生约33g甘油酯,即脂肪得率系数为33。由于部分碳源要用于合成其它非脂类物质,实际上脂肪得率系数很少超过22<sup>[14]</sup>。文献报道卷枝毛霉和高山被孢霉油脂发酵油脂得率系数分别为5.5和13.3<sup>[15]</sup>。利用深黄被孢霉在高糖培养基中生产单细胞油脂,在不同浓度的初始葡萄糖的批式发酵中得出的脂肪得率系数范围为16.6~20.1<sup>[12]</sup>。本文通过优化培养基组成和发酵条件,脂肪得率系数达到22.7,大大提高了该产油酵母菌对底物的利用率以及产油能力。

优化的摇瓶实验条件在7L全自动搅拌发酵罐进行试验,发酵终点生物量、油脂量分别为19.2g/L和14.2g/L,油脂含量为73.8%,接近优化结果。但发酵周期有所延长,因此发酵罐的实际工艺条件有待进一步优化。

### 3 结论

培养基内在条件(培养基的组成、浓度)及外在条件(发酵温度、时间、通气量等)都会影响微生物生长与代谢产物积累。为了提高Y4#菌发酵产油脂量及油脂含量,本研究首先应用均匀设计,对影响Y4#菌发酵产油的主要因素培养基碳氮比组成进行了考察,得到最佳碳氮比;并通过对培养基中无机盐组成的优化,提高了生物量。接着通过单因素试验设计对影响产油的金属离子进行优化和评价,确定了四种微量金属离子的最佳浓度。通过对发酵工艺参数的考察,确定了Y4#菌产油的最佳摇瓶发酵条件。通过均匀设计软件对二次多项回归方程求解及单因素分析得知在培养基组成分别为:葡萄糖70g/L,硫酸铵0.1g/L,酵母粉0.75g/L,磷酸二氢钾0.4g/L,七水硫酸镁1.5g/L,初始pH 6.0,在灭菌(121℃,15min)后添加ZnSO<sub>4</sub> 1.91 × 10<sup>-6</sup> mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 1.50mmol/L, MnCl<sub>2</sub> 1.22 × 10<sup>-4</sup> mmol/L, CuSO<sub>4</sub> 1.00 × 10<sup>-4</sup> mmol/L。发酵摇瓶装液量为250mL三角瓶装培养基50mL,接种量为10%。在上述条件下,30℃振荡(200r/min)培养120h时,菌体生物量达到18.2g/L,油脂量达到13.9g/L,油脂含量达到

76.1%。

### REFERENCES (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] Ratledge C. Lipid biotechnology, a wonderland for the microbial physiologist. *J Am Oil Chem Soc*, 1987, **64**: 1647-1656
- [3] Bajpai P, Bajpai PK, Ward OP. Eicosapentaenoic (EPA) production by *Mortierella alpona* ATCC 32222. *Appl Biochem Biotechnol*, 1991, **31**: 267-272
- [4] Singh A, Ward O. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA, C22:6). *Adv Appl Microbiol*, 1997, **45**: 271-312
- [5] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol*, 2004, **95**: 287-291
- [6] Liu H (刘波), Sun Y (孙艳), Li YH (李永红) et al. Progress on microbial glyceride biosynthesis and metabolic regulation in oleaginous microorganisms. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2005, **45**(1): 153-156
- [7] Zhao ZH (赵宗保). Toward cheaper microbial oil for biodiesel oil. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2005, **25**(2): 8-11
- [8] Fang KT (方开泰). Uniform Design and Uniform Design Table. Beijing: Science Press, 1994
- [9] Jiang Y (蒋毅), Chu J (储炬), Zhuang YP (庄英萍) et al. Nitrogen source optimization for production of rifamycin SV by uniform design method. *Chinese Journal of Antibiotics* (中国抗生素杂志), 2005, **30**(5): 260-263
- [10] Li ZF (李植峰), Zhang LC (张玲), Shen XJ (沈晓京) et al. A comparative study on four methods of fungi lipid extraction. *Microbiology* (微生物学通报), 2001, **28**(6): 72-75
- [11] Papanikolaou S, Sarantou S, Komaitis M et al. Repression of reserve lipid turnover in *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina* cultivated in multiple-limited media. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **97**: 867-875
- [12] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellina* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technology*, 2004, **95**: 287-291
- [13] Li YH (李永红), Liu H (刘波), Sun Y (孙艳) et al. Screening of oleaginous yeasts for broad-spectrum carbohydrates assimilation capacity. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2005, **25**(12): 39-43
- [14] Ratledge C. Biochemistry, Stoichiometry, Substrate and Economics. In: Moreton RS. Single Cell Oil. London: Longman, 1988 pp.33-70
- [15] Wynn JP, Hamid A, Li YH et al. Biochemical events leading to the diversion of carbon into storage lipids in the oleaginous fungi *Mucor circinelloides* and *Mortierella alpina*. *Microbiology*, 2001,