

## 培养条件对产油微生物生长的影响

马丽娟, 邢大辉, 王红蕾, 王晓俊, 薛冬桦

长春工业大学化学与生命科学学院, 长春 130012

**摘要:** 为了筛选出高产油菌株, 首先采用细胞形态学方法与细胞化学方法(苏丹 III 染色法)对 4 株高产油脂菌株进行初筛, 并通过索氏提取法对初筛菌株油脂含量进行分析, 确定 M2 菌株为实验菌株, 其油脂含量达 53.09%。为了增加产油微生物油脂产量, 本试验考察了不同发酵条件对其细胞生长和油脂积累的影响。优化工艺参数为: 10° Bx 玉米皮渣水解液为培养基质, 0.2% NaNO<sub>3</sub> 为氮源, pH 6.0、28°C 下发酵培养 6 d, 微生物油脂含量 75.21%, 菌体生物量 30.40 g/L, 油脂产量 22.86 g/L。气相色谱分析表明该油脂的脂肪酸组成与植物油相似, 主要含有 16 碳和 18 碳系脂肪酸, 可作为生物柴油的原料, 不饱和脂肪酸含量达 68%, 可应用于医药化工领域。

**关键词:** 微生物油脂, 玉米皮渣, 生物柴油

## Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganism

Lijuan Ma, Dahui Xing, Honglei Wang, Xiaojun Wang, and Donghua Xue

*School of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China*

**Abstract:** We used four strains (Y1, Y2, M1 and M2) to screen out the high lipid production strains. We first adopted cell morphology and cytochemical methods (Sudan III dyeing technique) to observe intracellular characteristics. Observation results indicated that M2 strain had the potential lipid accumulation capacity. To prove this, lipid content of these strains was determined by soxhlet extraction. One strain (M2) was found to produce lipids up to 53.09%. In order to increase the production of oleaginous microorganism, the effects of hydrolysate concentration, nitrogen source, pH, fermentation temperature and time on cell growth and lipid accumulation were studied. The optimal fermentation conditions were obtained as follows: corn starch byproduct hydrolysate concentration at 10°Bx as carbon source; NaNO<sub>3</sub> as nitrogen source at 0.2%; initial pH of 6.0; temperature at 28°C, cultivated for 6 d. Under these conditions, M2 strain accumulated lipids up to 75.21% on a cellular biomass basis with biomass yield of 30.40 g/L, and the corresponding lipid production reached 22.86 g/L. GC analysis demonstrated that the fatty acid composition of the lipid was similar to that of vegetable oil, which mainly contained 16- and 18-carbon fatty acids. Thus, microbial lipid is a promising material for biodiesel production, and its unsaturated fatty acid content reached around 68%. These unsaturated fatty acids show great potential applications in food, medicine and cosmetics industries.

**Keywords:** microbial lipids, corn starch byproduct, biodiesel

微生物油脂又称单细胞油脂, 是由酵母、霉菌、细菌和藻类等微生物在一定条件下利用碳水化合物

**Received:** June 13, 2008; **Accepted:** November 13, 2008

**Supported by:** the Foundation of Bureau of Science and Technology of Changchun City (No. 2007025).

**Corresponding author:** Donghua Xue. E-mail: xuedonghua@mail.ccut.edu.cn

长春市科技局科技计划基金项目(长科合 No. 2007025)资助。

物、碳氢化合物为碳源,在菌体内产生的大量油脂<sup>[1-3]</sup>。微生物油脂经转酯化可制备生物柴油<sup>[4,5]</sup>,随着日趋严重的全球性能源短缺与环境恶化,有必要开发替代化石燃料的可再生新能源,加快微生物油脂研究为生物柴油的制备提供原料<sup>[6-9]</sup>,这一课题的研究具有重要意义。

本研究采用细胞形态学方法与细胞化学方法对产油微生物进行初筛,并通过索氏提取法对初筛菌株油脂含量进行分析,确定 M2 菌株为实验菌株。考察不同糖度、氮源、温度、pH 和发酵周期等参数对其细胞生长和油脂积累的影响,旨在提高微生物油脂产量。利用气相色谱法对其脂肪酸组成进行分析,结果表明微生物油脂与植物油相似,主要含有 16 碳和 18 碳系脂肪酸,可作为制备生物柴油原料。同时,微生物油脂不饱和脂肪酸含量达 68%,可进行功能性油脂研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

以本实验室诱变菌种 Y1、Y2(酵母菌)和 M1、M2(霉菌)为实验菌株,分别保存于 YEPD 和 PDA 斜面上。采用玉米淀粉加工副产物皮渣为原料,经近红外光谱分析玉米皮渣中主要含有纤维素 12.54%,半纤维素 41.33%,淀粉 20.38%。采用酸酶结合水解方法,将玉米皮渣转化为可发酵性糖作为培养基。

### 1.2 培养基及培养条件

固体培养基: YEPD 和 PDA 培养基;液体种子培养: 采用 YEPD 培养基和 PDA 培养基,不加琼脂,28°C、75 r/min 振荡培养 24 h<sup>[4,7]</sup>。液体发酵培养: 10°Bx 玉米皮渣水解液为培养基,0.2% NaNO<sub>3</sub> 作氮源、pH 6.0、5% 接种量、28°C、75 r/min 振荡培养 6 d。

### 1.3 分析方法

#### 1.3.1 还原糖测定——费林试剂滴定法

分别配制费林试剂甲液和乙液,同时配制 1 g/L 葡萄糖标准溶液。费林试剂的标定,获得消耗葡萄糖标准液的体积平均值( $V_1$ ),进行玉米皮渣糖化液滴定,得到消耗玉米皮渣糖化液体积的平均值( $V_2$ )。计算公式:

$$DE = \frac{1 \times V_1 \times 10}{V_2 \times m \times G}$$

式中: DE-玉米皮渣糖化液还原糖含量(%);  $V_1$ -标定时消耗葡萄糖标准溶液(1 g/L)的体积(mL);  $V_2$ -测定时消耗玉米皮渣糖化液体积(mL);  $m$ -玉米皮渣糖化液质量(g);  $G$ -玉米皮渣糖化液中固形物含量(%)。

#### 1.3.2 生物量测定

将摇瓶发酵的培养物抽滤得到的湿菌丝体,自然条件下干燥,即得干菌体,以 g 干菌体/L 发酵液表示菌体生物量<sup>[5]</sup>。

#### 1.3.3 油脂提取和测定

利用石油醚索氏提取法提取油脂,差重法测菌油量<sup>[4,7]</sup>。

计算公式: 油脂含量(%)= $W_1/W \times 100$ ; 油脂产量(g/L)= $W_1/V$ ;

式中  $V$  为发酵液体积(mL),  $W_1$  为粗油量(g),  $W$  为菌体干重(g)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 细胞形态学方法对实验菌株初筛

本实验采用苏丹 III 染色法对 Y1 和 Y2(酵母菌)、M1 和 M2(霉菌)染色,经二甲苯洗脱,沙黄复染后镜检(图 1)。显微镜下菌丝体成粉红色,油脂颗粒呈亮黄色。由图可见, M2 菌株细胞内含有较多脂滴。

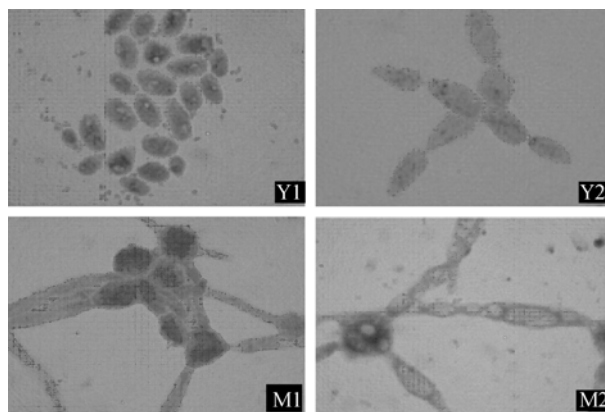


图 1 四株真菌苏丹 III 染色( $\times 1000$ )

Fig. 1 Sudan III dyeing of four strains ( $\times 1000$ ).

### 2.2 索氏提取法对实验菌株复筛

在初筛实验基础上,用索氏提取法对实验菌株细胞内油脂含量进行分析(表 1)。M2 菌体油脂生物量、油脂含量和油脂产量均较高。

### 2.3 糖浓度变化对微生物油脂产量的影响

调节玉米皮渣水解液糖度(7°Bx~11°Bx),考察糖浓度变化对 M2 菌株油脂产量的影响(图 2)。由图

表 1 四菌株细胞生长和油脂积累

Table 1 Cell growth and lipid accumulation of four strains

Strain	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)
Y1	17.34	8.85	51.03
Y2	2.68	1.12	41.85
M1	13.34	6.26	46.96
M2	24.77	13.15	53.09

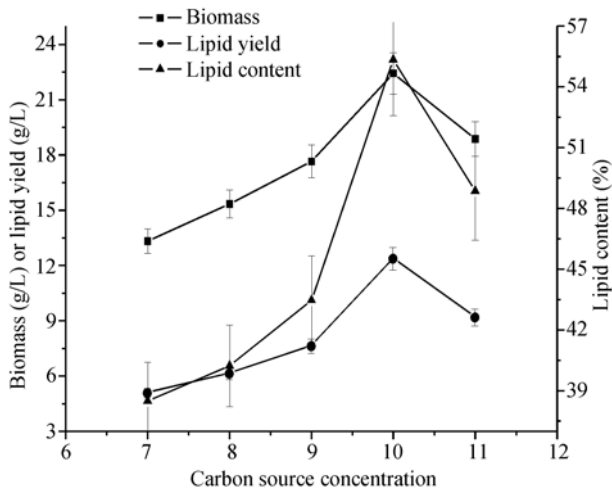


图 2 糖浓度对 M2 菌株细胞生长和油脂积累的影响  
Fig. 2 Effect of sugar content on cell growth and lipid accumulation of M2 strain.

可知, 糖浓度为 10°Bx 时, 菌体生物量 22.43 g/L, 油脂含量 55.34%, 油脂产量为 12.41 g/L。

2.4 pH 值对微生物油脂产量的影响

调节玉米皮渣水解液 pH 值(3.0~8.0), 考察 pH 值对微生物油脂产量的影响(图 3)。分析实验结果可见, M2 菌株易在中性至偏酸性环境中合成油脂, 当 pH 为 6.0 时, 菌体生物量 30.66 g/L, 油脂含量为 64.78%, 油脂产量 18.52 g/L。

2.5 氮源变化对微生物油脂产量的影响

分别以 0.2% 的 NaNO<sub>3</sub>、尿素、蛋白胨、硫酸铵和氯化铵为氮源, 考察氮源变化对微生物油脂产量的影响(图 4)。结果表明, NaNO<sub>3</sub> 是 M2 菌株油脂合成代谢的理想氮源, 菌体生物量 28.19 g/L, 油脂含量 63.59%, 油脂产量 17.93 g/L。

2.6 发酵周期对微生物油脂产量的影响

在 10°Bx 玉米皮渣水解液, pH 6.0, 28°C 条件下, 每隔 1 d 测定菌体生物量和油脂产量, 得到发酵周期对微生物油脂生物量和油脂产量的影响(图 5)。当发酵周期为 6 d 时, M2 生物量为 34.90 g/L, 油脂含量 79.12%, 油脂产量为 27.61 g/L。

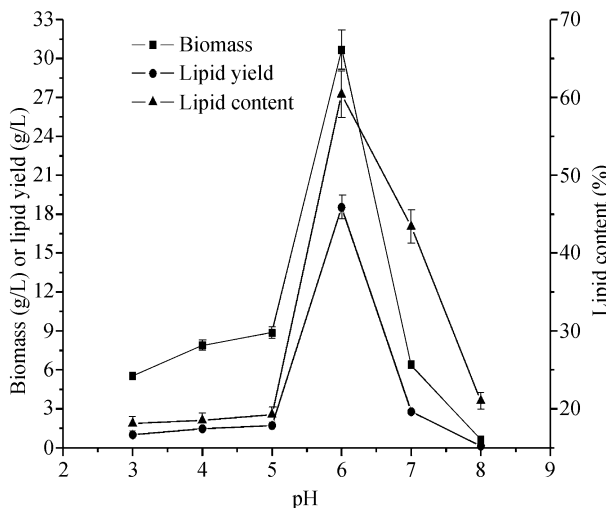


图 3 pH 对 M2 菌株细胞生长和油脂积累的影响  
Fig. 3 Effect of pH on cell growth and lipid accumulation of M2 strain.

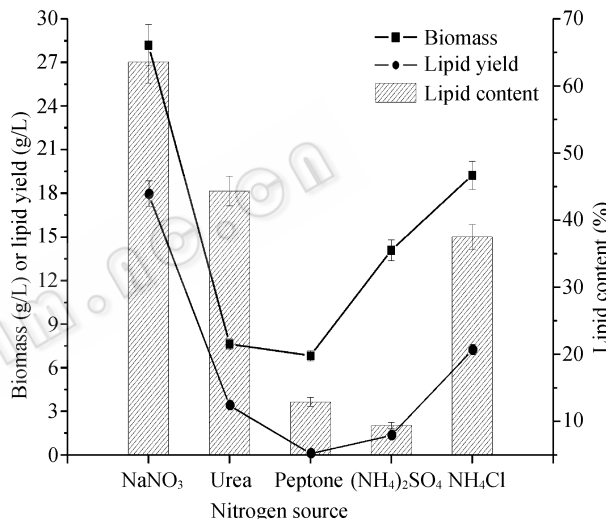


图 4 氮源变化对 M2 菌株细胞生长和油脂积累影响  
Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of M2 strain.

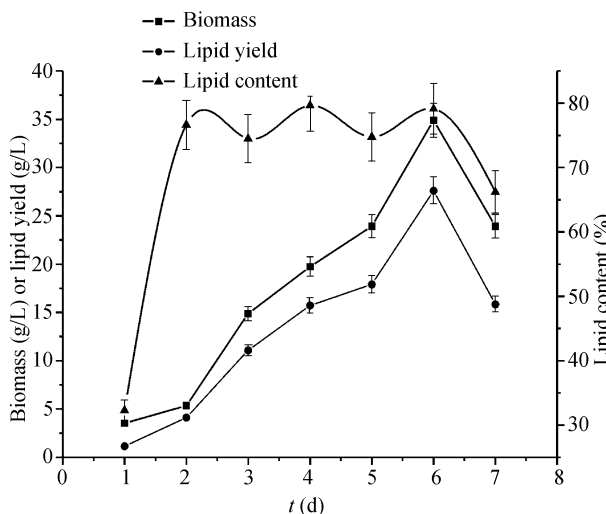


图 5 发酵周期对 M2 菌株细胞生长和油脂积累影响  
Fig. 5 Effect of fermentation period on cell growth and lipid accumulation of M2 strain.

2.7 发酵培养条件的优化

采用 DPS 数据处理系统软件(Data processing system, DPS), 设计三因素三水平优化实验。选定初始糖度( $X_1$ : 9.0°Bx ~11.0°Bx)、初始 pH 值( $X_2$ : 5.0~7.0) 和培养时间( $X_3$ : 5~7 d)为主要因素, 以菌体生物量( $Y_1$ )和油脂含量( $Y_2$ )为响应值进行优化实验, 并对实验结果(表 2 和表 3)进行多项回归分析, 得到菌体生物量( $Y_1$ )和油脂含量( $Y_2$ )对  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  的多项回归方程。初始糖度、初始 pH 值、培养时间交互作用对菌体生物量和油脂含量影响变化趋势由图 6 和图 7 可见。由响应曲面分析得到优化工艺参数: 初始糖度为 10.0°Bx, pH 值 6.0, 发酵周期 6 d, 预测菌体生物量为 30.78 g/L, 油脂含量为 75.24%。

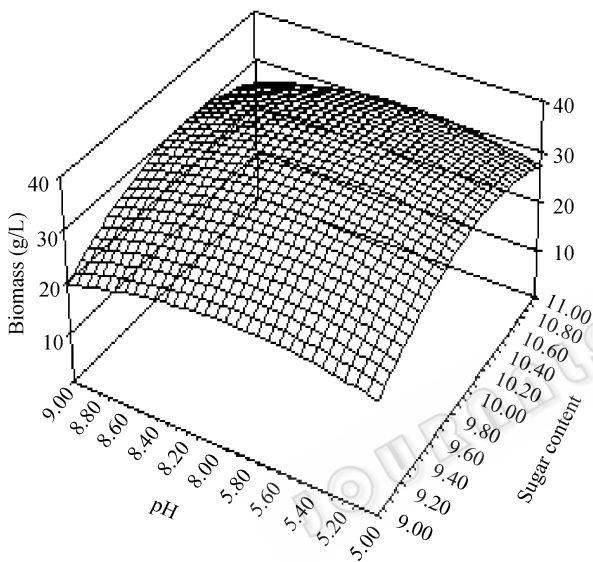


图 6 初始糖度和 pH 对生物量的响应面分析  
Fig. 6 Response surface of  $Y_1$  vs  $X_1$ ,  $X_2$ .

表 2 DPS 菌体生物量

Table 2 DPS strain biomass

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Biomass (g/L)	17.32	18.34	17.65	29.43	28.49	29.21	22.91	26.64	26.31

Equation 1:  $Y_1$  (Biomass) = -848.13 + 163.75 $X_1$  + 13.46 $X_3$  - 7.81 $X_1^2$  - 0.27 $X_2^2$  - 0.99 $X_3^2$  - 0.58 $X_1X_3$  + 0.59 $X_2X_3$ .

表 3 DPS 微生物油脂含量

Table 3 DPS lipid content

Group	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lipid content (%)	32.29	45.38	48.44	65.34	67.81	73.23	65.48	69.21	65.43

Equation 2:  $Y_2$  (Lipid content) = -2037.38 + 336.79 $X_1$  + 93.21 $X_2$  + 25.87 $X_3$  - 14.42 $X_1^2$  - 2.43 $X_2^2$  - 2.31 $X_3^2$  - 6.00 $X_1X_2$ .

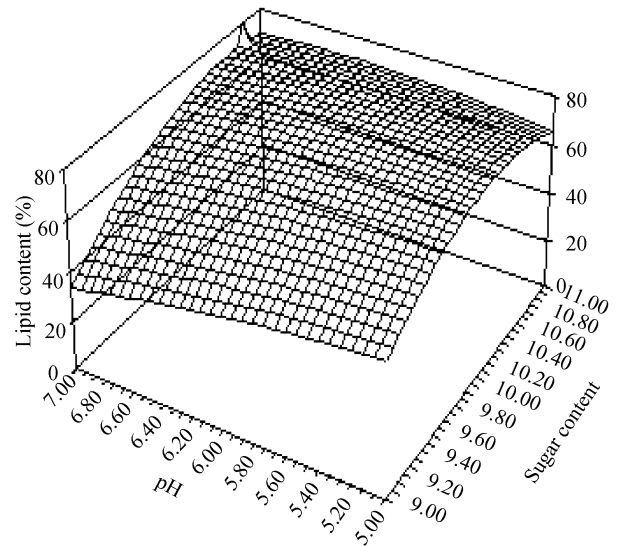


图 7 初始糖度和 pH 对油脂含量的响应面分析  
Fig. 7 Response surface of  $Y_2$  vs  $X_1$ ,  $X_2$ .

2.8 产油微生物发酵稳定实验

在上述 DPS 优化实验基础上, 确定稳定实验工艺参数: 10°Bx 玉米皮渣水解液, 0.2% NaNO<sub>3</sub> 为氮源, 在 pH 6.0, 28°C, 发酵周期为 6 d 条件下, 进行 5 批次重复实验(表 4)。结果表明, 在此发酵条件下, 平均菌体生物量为 30.40 g/L, 平均油脂含量为 75.21%, 达到 DPS 预测值。

2.9 微生物油脂组成分析

微生物油脂甲酯化: 取定量干燥菌体研碎, 苯-石油醚浸提, 加入 NaOH-CH<sub>3</sub>OH 溶液, 50°C 恒温 15 min, 静置分层, 取上清液进行气相色谱分析 [HP5890 II 型气相色谱仪, 色谱柱: DB23(30 m×0.25 mm×0.2 μm), 进样口温度: 250°C, 氮气作载气]。由气相色谱分析结果(图 8)可见, 微生物油脂中

表 4 M2 菌株发酵稳定实验

Table 4 Stabilized experiment of M2 strain

Group	Biomass (g/L)	Lipid yield (g/L)	Lipid content (%)
1	31.91	23.87	74.79
2	30.64	23.00	75.06
3	29.66	22.65	76.36
4	30.31	22.54	74.38
5	29.50	22.26	75.45
Average	30.40	22.86	75.21

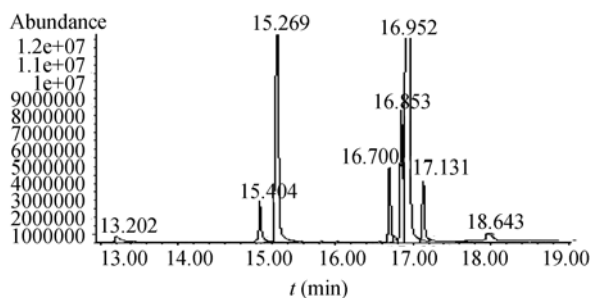


图 8 微生物油脂气相色谱图

Fig. 8 Gas chromatogram chart of microbial oils.

主要含有 16 碳和 18 碳系脂肪酸, 与植物油相似, 可作为制备生物柴油原料。同时, 不饱和脂肪酸含量达 68%, 可进一步用作功能性油脂研究。

### 3 结论

本研究应用细胞形态学和细胞化学染色方法初筛实验菌株, 索氏提取法复筛实验菌株, 初筛发现 M2 菌细胞内富集大量油滴, 复筛与初筛结果吻合, 确定 M2 菌株为理想实验菌株。

以 M2 菌株为实验菌株, 考察了发酵条件对其细胞生长和油脂积累的影响, 并利用 DPS 数据处理系统设计发酵条件优化实验, 确定优化发酵工艺参数为: 10°Bx 玉米皮渣水解液为碳源、0.2% NaNO<sub>3</sub> 为氮源、pH 6.0、28°C 下发酵培养 6 d, 菌体生物量为 30.40 g/L, 油脂含量达到 75.21%, 油脂产量为 22.86 g/L。利用廉价的玉米皮渣为原料, 高密度发酵

制备微生物油脂的研究, 不仅为生物柴油的制备提供原料, 而且为玉米淀粉加工副产物的综合利用提供了新思路。

### REFERENCES

- [1] Papanikolaou S, Komaitis M, Aggelis G. Single cell oil (SCO) production by *Mortierella isabellin* grown on high-sugar content media. *Bioresour Technol*, 2004, **95**: 287–291.
- [2] Ratledge C, Wynn J. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv Appl Microbiol*, 2002, **51**: 1–5.
- [3] Ratledge C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Biochem Soc Trans*, 2002, **30**: 1047–1050.
- [4] Dai CC, Dai YJ, Zhao M. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *African J Biotech*, 2007, **6**(18): 2130–2134.
- [5] Li YH, Liu B, Zhao ZB, et al. Optimization of culture conditions for lipid production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(4): 650–656.  
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.
- [6] Li YH, Zhao ZB, Bai FW. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme Microb Technol*, 2007, **41**: 312–317.
- [7] Zhu M, Yu LJ, Wu YX. An inexpensive medium for production of arachidonic acid by *Mortierella alpine*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, **30**: 75–79.
- [8] Zhang W, Wu H, Zong MH. Study on microbial oil production with *Chlorella pyrenoidosa*. *Microbiology*, 2008, **35**(6): 855–860.  
张薇, 吴虹, 宗敏华. 蛋白核小球藻发酵产油脂的研究. *微生物学通报*, 2008, **35**(6): 855–860.
- [9] Dong XR, Cao J, Zhao B, et al. Determination and extraction of fungilipids. *J Zhengzhou Instit Tech*, 2002, **23**(1): 14–18.  
董欣荣, 曹健, 赵斌, 等. 几种真菌油脂的检测与提取. *郑州工程学院学报*, 2002, **23**(1): 14–18.