

深黄被孢霉利用不同碳源产油脂比较

邢大辉¹, 潘安龙¹, 薛冬桦¹, 方鸣玉¹, 谷冉峰²

1 长春工业大学化学与生命科学学院, 长春 130012

2 长春长生基因药业股份有限公司, 长春 130012

摘要: 本研究主要探讨深黄被孢霉 M2 菌株对生物质全糖的利用, 考察其碳源同化能力、不同碳源下产脂情况以及对玉米皮渣的利用能力。研究结果表明, M2 菌株能够利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖进行生长和油脂积累。M2 菌株以 6% 糖浓度的玉米皮渣水解液为底物发酵培养, 油脂微生物生物量达 18.2 g/L, 干菌体油脂含量 45.7%, 单位体积发酵液油脂产量为 8.3 g/L。

关键词: 深黄被孢霉, 微生物油脂, 生物质, 玉米皮渣, 发酵

Biomass carbohydrates assimilation and lipid accumulation by *Mortierella isabellina*

Dahui Xing¹, Anlong Pan¹, Donghua Xue¹, Mingyu Fang¹, and Ranfeng Gu²

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

2 Changchun Changsheng Gene Pharmaceutical Company Limited, Changchun 130012, China

Abstract: Biomass carbohydrates assimilation and lipid accumulation by *Mortierella isabellina* M2 strain were investigated. Corn fiber hydrolysate was specially studied. The results showed *M. isabellina* M2 strain achieved growth and lipid accumulation while glucose, xylose, mannose and arabinose were introduced as single carbon source, respectively. When *M. isabellina* M2 strain was cultivated on corn fiber hydrolysate with 6% sugars concentration, the biomass reached 18.2 g/L, the lipid content of dry mycelia was 45.7%, and the lipid yield achieved 8.3 g/L. It provided a promising perspective for microbial oils production with biomass hydrolysates.

Keywords: *Mortierella isabellina*, microbial oil, biomass, corn fiber, fermentation

微生物油脂又称单细胞油脂, 是指某些微生物在一定条件下将碳水化合物、碳氢化合物和普通油脂等碳源转化为菌体内大量储存的油脂。这些油脂一般占菌体干重的 20% 以上^[1]。产油脂微生物主要包括酵母、霉菌、微藻和细菌, 其中以对酵母菌和

丝状霉菌的研究居多^[2-4], 少数产油微生物能在胞内积累超过细胞干重 70% 的油脂。早期微生物油脂的研究主要集中在功能性油脂的开发上, 随着国际能源危机和国内生物柴油产业所面临的原料困境, 以微生物油脂进行生物柴油生产的研究日益受到关注^[5-8]。

Received: September 10, 2009; **Accepted:** November 13, 2009

Supported by: Foundation of Department of Education of Jilin Province (No. 2008100), Foundation of Bureau of Science and Technology of Changchun City (No. 2009035).

Corresponding author: Donghua Xue. Tel: +86-431-85716471; E-mail: xuedonghua@mail.ccut.edu.cn
吉林省教育厅科技重点项目 (No. 2008100), 长春市科技局科技支撑计划项目 (No. 2009035) 资助。

生物质是植物通过光合作用生成的有机物, 主要包括淀粉、纤维素、半纤维素和木质素等。国内外以深黄被孢霉发酵生产油脂的研究多集中在以高浓度葡萄糖为营养碳源进行油脂生产或提取 γ -亚麻酸^[9-11], 而以半纤维素、纤维素等生物质资源进行的发酵产脂研究鲜有报道。本实验主要研究目的在于探讨深黄被孢霉对生物质全糖的利用, 针对深黄被孢霉的广谱碳源同化能力以及在不同碳源上的油脂积累情况进行考察, 并进一步以玉米淀粉加工业副产物——玉米皮渣为原料, 采用酶法、酸法协同水解后考察深黄被孢霉的生长和油脂积累情况, 为其更广泛的工业化应用提供依据, 使微生物油脂制备具有更广泛的原料基础, 为缓解生物柴油产业的原料来源问题提供可替代的解决途径。

1 材料与方法

1.1 菌株

深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* M2 菌株, 由长春工业大学工业微生物实验室提供, 保存于土豆汁斜面培养基。

1.2 培养基及培养条件

碳源同化实验: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2%; MgSO_4 , 0.1%; KH_2PO_4 , 0.1%; K_2HPO_4 , 0.1%; 琼脂, 1.5%; 添加 2% 碳源于 28℃ 培养。

碳源发酵产脂: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2%; MgSO_4 , 0.1%; KH_2PO_4 , 0.1%; K_2HPO_4 , 0.1%; 添加 6% 碳源 28℃、80 r/min 振荡培养。

玉米皮渣水解液: 以玉米淀粉加工业副产物-玉米皮渣为原料 (长春大成集团提供), 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%。应用酶酸两步法水解玉米皮渣, 取 1000 g 玉米皮渣按固液比 1:6 加水混匀, 先后加入淀粉酶和糖化酶水解后收集滤液, 滤渣按固液比 1:6 加入 0.5% 盐酸, 100℃ 水解 4 h, 压榨过滤。混合两步滤液获得玉米皮渣水解液 10.6 L, 调整糖浓度至 6%, 添加 0.2% 氮源, 28℃、80 r/min 好氧培养。

1.3 分析方法

1.3.1 扫描电镜形态观察

将 M2 菌划线接种于琼脂平板培养基, 并将灭

菌的洁净盖玻片斜插于划线处, 28℃ 下培养 96 h, 附着于载玻片上的菌丝体经钼酸固定、脱水、干燥及表面镀金后扫描电镜下观察, 工作电压为 25 kV。

1.3.2 玉米皮渣水解液单糖组成分析

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪, 示差折光检测器, 美国博乐 87C 色谱柱, 流动相为高纯水, 流速 0.6 mL/min; 柱温 80℃; 采用面积归一法定量分析。玉米皮渣水解液含葡萄糖 36.95%; D-木糖 20.18%; L-阿拉伯糖 42.52%; 甘露糖 0.35%, 五碳糖含量达 60% 以上。

1.3.3 苏丹 III 染色方法

菌体涂片后, 采用 3% 苏丹 III 的 70% 乙醇溶液染色 15 min, 二甲苯洗脱, 干燥后 0.5% 沙黄复染 15 min, 水洗脱色至洗脱液无色, 干燥后观察。显微镜下菌丝体呈粉红色, 油脂颗粒呈亮黄色。

1.3.4 生物量测定

将发酵的培养物抽滤得到湿菌丝体, 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^[12-13]。

1.3.5 油脂提取和测定

利用索氏提取法提取油脂, 差重法测菌油量^[13]。计算公式: 油脂含量 (%) = $W_1/W \times 100$ 。式中 W_1 为粗油量 (g), W 为菌体干重 (g)。

2 结果

2.1 M2 菌株广谱碳源的同化利用

天然木质纤维素类生物质是由纤维素、半纤维素和木质素3大部分组成。纤维素水解产物葡萄糖易被微生物利用, 是常规发酵碳源。半纤维素主要是五碳糖的聚合物, 水解产物以D-木糖和L-阿拉伯糖为主。许多微生物, 如酿酒酵母, 不能发酵五碳糖生产酒精。因此, 高效利用半纤维素水解产物是工业微生物研究中的重要课题。

以葡萄糖、D-木糖、甘露糖和L-阿拉伯糖为单一碳源, 在固体培养基上进行 M2 菌株的培养, 考察其对各单糖的同化能力 (图 1)。研究结果表明深黄被孢霉 *Mortierella isabellina* 能够在葡萄糖、D-木糖、甘露糖和L-阿拉伯糖为碳源的培养基上生

长, 此菌株不但可以利用六碳糖作为营养碳源, 而且能够利用五碳糖进行生长繁殖, 具有良好的广谱碳源同化能力。

2.2 深黄被孢霉 M2 菌丝体的显微观察

深黄被孢霉属丝状真菌, 在适宜的培养基内生长后菌丝粗壮且分叉较多, 具有很多藕节状膨大, 内含丰富油脂颗粒。扫描电镜图见图 2, 参照经苏丹 III 染色的菌丝体 (图 3), 可以推断菌丝体内呈亮白色的区域为油脂脂滴密集区。

2.3 不同碳源下 M2 菌株中的油脂积累

分别以葡萄糖、木糖、甘露糖、阿拉伯糖和玉米皮渣水解液为碳源进行液体培养, 采用苏丹 III 染色法染色后镜检 (图 3)。由图可见, 无论以五碳糖和六碳糖, 或玉米皮渣水解液培养, M2 菌株的菌丝体都有很多藕节状膨大, 明黄色脂肪滴清晰可见, 尤其在菌丝的分叉处和菌丝体膨大处油脂积累明显, 按体积估算约占整个菌丝体的 50%。由此提示深黄被孢霉 M2 菌株在五碳糖、六碳糖和玉米皮渣水解液中培养后, 油脂积累丰富, 具有广泛的应用前景。

2.4 不同碳源对 M2 菌株发酵产脂的影响

分别以 6% 糖浓度的葡萄糖、D-木糖、甘露糖、L-阿拉伯糖和玉米皮渣水解液为碳源, 添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

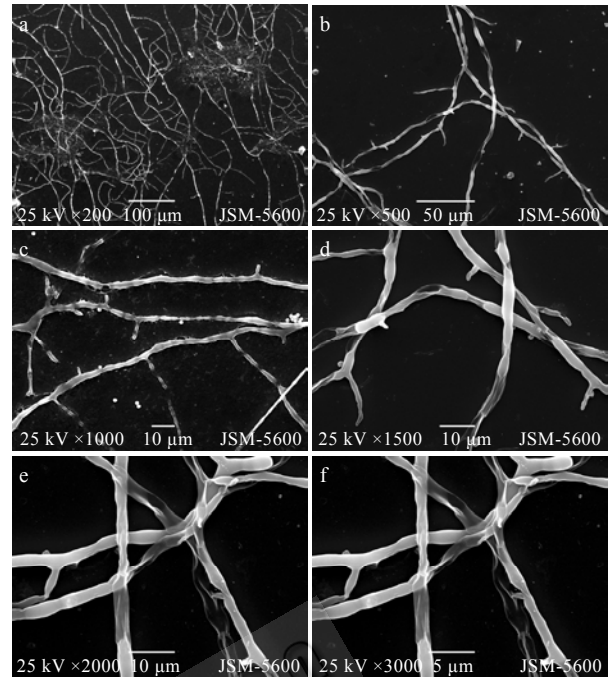


图 2 深黄被孢霉 M2 菌株的扫描电镜显微图

Fig. 2 Micrograph of M2 strain by SEM. (a) 200 \times . (b) 500 \times . (c) 1000 \times . (d) 1500 \times . (e) 2000 \times . (f) 3000 \times .

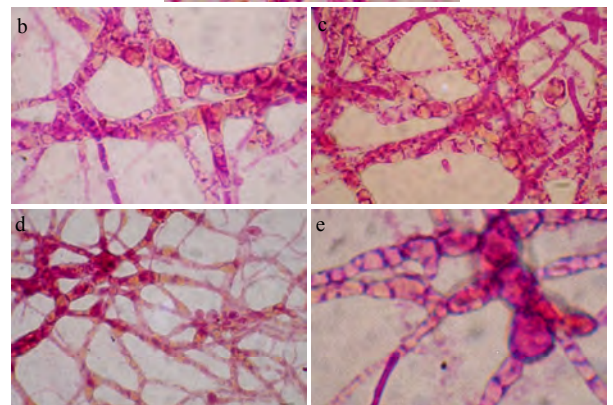
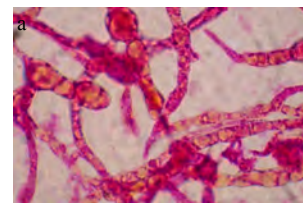


图 3 不同碳源下油脂积累的苏丹 III 染色观察 (1000 \times)

Fig. 3 *Mortierella isabellina* stained with Sudan III culturing with various carbon sources (1000 \times). (a) Glucose. (b) Xylose. (c) Mannose. (d) Arabinose. (e) Corn fiber hydrolysate.

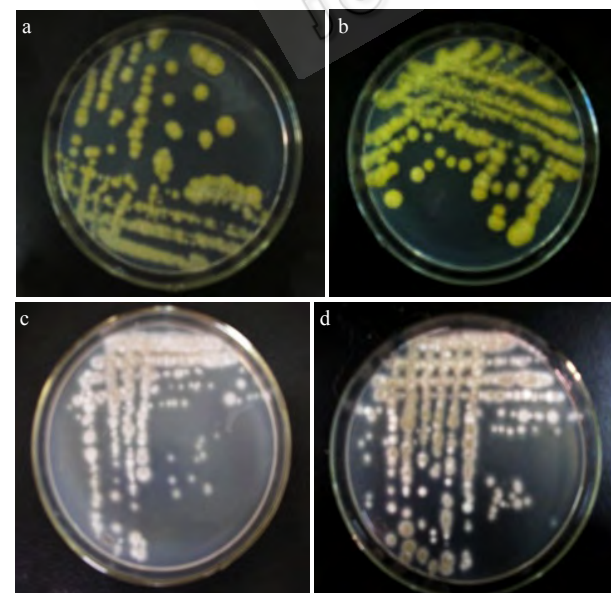


图 1 深黄被孢霉广谱碳源同化能力

Fig. 1 Broad-spectrum carbon sources assimilation by *Mortierella isabellina*. (a) Glucose. (b) Xyloses. (c) Mannose. (d) Alabinose.

氮源后发酵培养 96 h, 结果见表 1。结果显示, 深黄被孢霉在葡萄糖为碳源时其油脂含量最高, 达到 66%, 油脂产量达到 6.9 g/L。以玉米皮渣水解液为

发酵底物时其生物量和油脂含量分别达到 18.2 g/L 和 45.7%，与单糖碳源比较，玉米皮渣水解液获得较高的生物量，其原因可能是由于玉米皮渣中含有利于菌体生长的生物素类物质，有效促进了菌体的生长繁殖，同时以玉米皮渣水解液培养时其油脂产量最高，达到 8.3 g/L，表明 M2 菌株发酵生物质全糖进行油脂积累具有明显的优势和良好的工业潜力。

与国内外同类研究比较 (表 2)，在以工业副产物为发酵基质进行微生物油脂代谢合成的研究中，深黄被孢霉 M2 菌株获得了较高的油脂产量。对于玉米淀粉加工业每年产生的大量玉米皮渣而言，本研究结果拓展了其应用范围，提高了生物质资源的

经济价值，同时可为生物柴油产业提供丰富的油脂资源，表现出良好的工业应用前景。

表 1 不同碳源发酵培养^{a,b}

Table 1 Fementation with various carbon sources^{a,b}

Carbon source	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)	Residual sugar (%)
Glucose	10.5	66.0	6.9	2.3
D-xylose	8.6	59.4	5.1	2.2
Mannose	9.5	53.5	5.1	2.2
L-arabinose	10.3	52.2	5.4	1.9
Corn fiber hydrolysate	18.2	45.7	8.3	0.6

^a The cultures were performed at 28°C for four days with initial sugar concentration 6%.

^b Data are presented as mean values from duplicate experiments.

表 2 不同微生物利用工农业副产物油脂积累研究

Table 2 Lipid production on agro-industrial residues by various microorganisms

Strains	Carbon source	Biomass (g/L)	Lipid content (%)	Lipid yield (g/L)	Reference
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Pectin	4.1	10.0	0.4	[11]
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Monosodium glutamate wastewater	25.0	20.0	5.0	[7]
<i>Lipomyces starkeyi</i>	Sewage sludge	9.4	68.0	6.4	[5]
<i>Cunninghamella echinulata</i>	Raw glycerol	7.8	25.6	2.0	[3]
<i>Mortierella isabellina</i>	Corn fiber hydrolysate	18.2	45.7	8.3	This work

3 讨论

碳源是微生物生长繁殖和代谢的主要营养物质，多数微生物对葡萄糖具有良好的利用能力，而对于木糖、阿拉伯糖等五碳糖的利用能力却有很大区别。深黄被孢霉M2菌株能够同化六碳糖（葡萄糖、甘露糖）和五碳糖（木糖、阿拉伯糖）进行油脂积累，表现出良好的生物质全糖利用能力，为理想的油脂微生物。

玉米皮渣是湿法生产玉米淀粉的副产物，约占玉米加工量的10%，主要含有淀粉、纤维素和半纤维素等组分，其中半纤维素和纤维素的比例超过50%，是典型的既含有五碳多聚糖又含有六碳多聚糖的生物质资源。深黄被孢霉M2菌株能够利用玉米皮渣水解液中的生物质全糖进行生长和油脂积

累，以6%水解糖为底物发酵时，其油脂含量和生物量分别达到了45.7%和18.2 g/L。

因此，采用深黄被孢霉为生产菌株，以纤维素类生物质资源为原料进行油脂生产，具有广泛的工业化应用前景，不但能够提高废弃生物质资源的利用效益，降低环境污染和减少资源浪费，还可为生物柴油产业提供来源更为广泛的油脂资源，为其产业发展所面临的原料瓶颈提供解决途径。

REFERENCES

- [1] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 2004, **86**: 807–815.
- [2] 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.
- [3] Fakas S, Papanikolaou S, Batsos A, *et al.* Evaluating renewable carbon sources as substrate for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. *Biomass Bioenergy*, 2009, **33**: 573–580.
- [4] Dai CC, Tao J, Xie F, *et al.* Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity. *Afri J Biotechnol*, 2007, **6**(18): 2130–2134.
- [5] Angerbauer C, Siebenhofer M, Mittelbach M, *et al.* Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 3051–3056.
- [6] Huang C, Zong MH, Wu H, *et al.* Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresour Technol*, 2009, **100**: 4535–4538.
- [7] Xue FY, Miao JX, Zhang X, *et al.* Studies on lipid production by *Rhodotorula glutinis* fermentation using monosodium glutamate wastewater as culture medium. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 5923–5927.
- [8] Zhu LY, Zong MH, Wu H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 7881–7885.
- [9] 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.
- [10] Tang SH, Chen MK, Yang JB, *et al.* Research of producing oil by *Mortierella isabellina*. *China Oils Fats*, 2007, **32**(12): 35–37.
汤世华, 陈明镔, 杨建斌, 等. 深黄被孢霉产脂的研究. *中国油脂*, 2007, **32**(12): 35–37.
- [11] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, *et al.* Lipid production by oleaginous *Mucorales* cultivated on renewable carbon sources. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2007, **109**: 1060–1070.
- [12] 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.
- [13] Ma LJ, Xing DH, Wang HL, *et al.* Effect of culture conditions on cell growth and lipid accumulation of oleaginous microorganisms. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(1): 55–59.
马丽娟, 邢大辉, 王红蕾, 等. 培养条件对产油微生物的影响. *生物工程学报*, 2009, **25**(1): 55–59.



快 讯

刘杏忠课题组论文获 Faculty of 1000 Biology 推荐

中国科学院微生物所刘杏忠研究员在 PNAS 杂志上发表的题为“Evolution of nematode-trapping cells of predatory fungi of the Orbiliaceae based on evidence from rRNA-encoding DNA and multiprotein sequences”的研究论文被“Faculty of 1000 Biology”推荐为“Must Read (必读)”。

来自美国杜克大学的 Joe Heitman 教授点评大意如下: 该研究论文阐明了捕捉线虫的肉食性真菌进化历程。这一成果为食线虫真菌和线虫的种间相互作用提供了基础研究模型。子囊菌门、担子菌门和结合门中都有具备捕食能力的真菌。对这些捕食真菌的进化进行深入的研究, 将推进对平行进化和发育可塑性的认识 (详细评论链接: <http://f1000biology.com/article/id/1098524>)。

“Faculty of 1000 Biology”创办于 2002 年 1 月, 根据全球资深科学家的意见, 提供对近期发表的生物科学论文的快速评论, 目的是帮助广大科研人员遴选和发现有价值的研究工作。

来源: 中国科学院微生物研究所