

利用蔗渣半纤维素水解液产油酵母的筛选、 鉴定及发酵实验

潘丽霞¹ 杨登峰² 邵利¹ 陈桂光¹ 梁智群^{1*}

(1. 广西大学生命科学与技术学院 南宁 530004)

(2. 广西科学院 南宁 530003)

摘要: 对已分离到的产油酵母通过木糖摇瓶发酵, 从中筛选到 2 株 H2-1 和 J2-2 利用蔗渣半纤维素水解液高产油脂酵母, 其利用蔗渣半纤维素水解液油脂得率系数分别为 13.49 和 10.28, 均显示出对蔗渣半纤维素水解液的高转化率。根据常规生理生化特征和 26S rDNA 序列分析结果, 确认 H2-1 为小红酵母(*Rhodotorula minuta*), J2-2 为粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)。

关键词: 产油酵母, 木糖, 蔗渣, 半纤维素水解液, 鉴定

Screening, Identification and Fermentation Characters of Oleaginous Yeasts by Utilizing Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysates

PAN Li-Xia¹ YANG Deng-Feng² SHAO Li¹ CHEN Gui-Guang¹ LIANG Zhi-Qun^{1*}

(1. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004)

(2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530003)

Abstract: In this paper, by fermentation xylose in shake flask, two oleaginous yeasts named H2-1 and J2-2 which had high performance in utilizing sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates were selected from ten oleaginous yeasts isolated in our laboratory before. The lipid coefficient of two yeasts reached 13.49 and 10.23, respectively, shows a high efficiency transformation into lipid by utilizing sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates. H2-1 was identified as *Rhodotorula minuta* and J2-2 was identified as *Rhodotorula glutinis* based on physiological and biochemical characteristics and 26S rDNA sequence analysis.

Keywords: Oleaginous yeast, Xylose, Sugar cane bagasse, Hemicellulose hydrolysate, Identify

进入 21 世纪, 地球环境问题特别是二氧化碳排放所造成的地球化温室效应愈发严重, 并且化石资源的有限开采量也是不争的事实, 动、植物油脂的供应量也十分有限, 油脂资源势必走向多种渠道开发的途径。自然界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 72%^[1]。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^[2]。利用微生物生产油脂是开发新的油脂资源的重要方向, 同依赖

* 通讯作者: Tel: 0771-3270733; 信箱: zqliang@gxu.edu.cn

收稿日期: 2008-01-06; 接受日期: 2008-03-06

动物和油料植物获取油脂的传统方法相比具有可连续生产、周期短、不受季节和气候的影响、原料来源广泛、产品高值化潜力大的优点,有广阔的工业化应用前景^[3]。但是由于微生物油脂生产成本较高,为降低生产成本,便于实现规模化工业生产,有必要把微生物油脂生产转向利用一些农副产品和工业废物^[4]。

广西是种植甘蔗大省,蔗渣资源极其丰富。蔗渣是一种含有丰富纤维素类物质的制糖工业废料。虽然其中一部分可继续被造纸工业利用,但其25%~29%的半纤维素不能被利用。蔗渣还是少数几种半纤维素含量极高的植物纤维材料之一。半纤维素的主要成分是木聚糖,酸很容易将其水解为单糖。完全水解后可得到木糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等,木糖和葡萄糖的含量占有组分的72%~94%,两者的比例为2.6~4.7:1^[5]。可见半纤维素水解产物主要为木糖,其次为葡萄糖。葡萄糖为速效碳源,自然界绝大部分微生物都可以利用。为了能有效地利用资源丰富的半纤维素这种废料,必须首先有效利用木糖。

本实验从已分离到的10株利用葡萄糖产油酵母中,通过木糖为唯一碳源摇瓶发酵,得到2株目的菌并研究了其利用蔗渣半纤维素水解液发酵产油能力,同时对这2株菌进行了生理生化及分子生物学鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种

本实验室已分离到的10株具有不同形态特征的产油酵母。

1.2 主要药品试剂

酵母粉和蛋白胍购于英国OXOID公司,D-木糖($\geq 99.5\%$)、葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 NaH_2PO_4 购于上海生物工程有限公司,蔗渣(广西南宁糖业公司明阳糖厂),大孔树脂(HPD500,中国,河北沧州化工厂产),其他有机药品均为分析纯。

1.3 培养基

YEPD培养基:葡萄糖20 g/L,酵母粉10 g/L,蛋白胍10 g/L;固体培养基在YEPD基础上加入2%琼脂粉。

液体种子培养基:木糖20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, 酵母粉0.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L。

氮源限制性发酵培养基:木糖40 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 7 g/L, NaH_2PO_4 2 g/L, 酵母粉1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L。

蔗渣半纤维素水解液的制备:用24.47 mmol/L的稀硫酸,按液/固=10与蔗渣混合,在蒸气压力 2.5×10^5 Pa下水解2.5 h,然后在70℃时将水解液真空浓缩至可溶性固形物含量约100 g/L,然后用固体NaOH调pH为3.0,用大孔树脂脱毒^[6]。处理过的水解物用蒸馏水稀释到40 g/L并调pH为5.0。

蔗渣半纤维素水解液发酵培养基:在1 L制备好的蔗渣半纤维素水解液中添加2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 7 g KH_2PO_4 , 2 g NaH_2PO_4 , 1 g 酵母粉, 1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

1.4 产油酵母的摇瓶培养

将YEPD斜面上长好的酵母接种于50 mL液体种子培养基中,于28℃,180 r/min摇床培养30 h~48 h。以10%接种量接种于45 mL限氮发酵培养基或蔗渣半纤维素水解液发酵培养基中,在相同条件下摇床培养120 h或168 h。发酵结束测定菌体生物量、油脂产量、残糖和残氮。

1.5 分析方法

1.5.1 生长测定:取一定量的培养液经4000 r/min离心,蒸馏水洗涤2次,65℃烘干至恒重(约24 h),以g干菌体/L发酵液表示菌体生物量。

1.5.2 残糖的测定:DNS法^[7]。

1.5.3 油脂含量测定:酸热法^[8]。

1.5.4 残氮的测定:凯氏定氮法^[9]。

1.6 酵母菌的鉴定

1.6.1 常规形态和生理生化特征:参照《酵母菌的特征与鉴定手册》的鉴定方法^[10]。

1.6.2 26S rDNA的PCR扩增及序列分析^[11]:提取待测菌株总DNA作为模版,用引物5'-GCATA TCAAAAGCGGAGGAAAAG-3'和5'-GGTCCGTGT TTCAAGACGG-3',聚合酶链式反应(PCR)扩增H2-1和J2-2菌株的26S rDNA D1/D2 domains基因。扩增产物经纯化后,送上海捷瑞生物工程有限公司测序。将所测得的序列在GenBank核酸序列数据库中进行同源序列搜索(Nucleotide-nucleotide Blast),进行序列比对,找到同源性最高的已知菌种的核酸

序列用 Clustal1.83 软件进行多重比对, 将对比结果转移到 MEGA2.1 软件, 用 Neighbour-joining 方法画出系统进化树。

2 结果

2.1 酵母菌利用木糖产油能力的筛选

当培养条件中碳源充足而某些营养成分(特别是氮源)缺乏时, 产油微生物菌体细胞分裂速度锐减, 代谢转为以消耗碳源并合成和积累油脂为主。因此, 将 10 株产油酵母接种到限氮发酵培养基中, 培养 120 h, 发酵结束测定的结果见表 1。发酵结束时测得发酵液中的残氮很低, 基本接近于零(数据省略, 下同)。

由表 1 的摇瓶发酵结果可以看出, 在组成简单的限氮培养条件下, 其中 H2-1 油脂含量最高, 达到 38.94%, 油脂得率系数 14.56。J2-2、H3-1、H3-2 和 J3-3 的油脂质量分数都超过 20%, 分别为 23.21%、25.60%、24.62%和 24.50%, 其中 J2-2 的油脂得率系数也比较高, 达到 10.73。

油脂得率系数是评价产油微生物经济性的重要指标, 油脂得率系数越高, 表明菌体对底物的利用效率越高。孔祥莉等^[12]报道 *Lipanyces starkeyi* 2#利

用木糖油脂得率系数为 11。施安辉等^[13]报道 *Rhodotonia glutinis* GLR₃ 利用木糖在碳氮比 33.9 时, 油脂质量分数可以达到 41.4%, 但油脂得率系数只有 6.2。李永红等^[14]筛选的 10 株酵母中, 利用木糖产油油脂得率系数最高的 4# *Rhodospiridium toruloides* AS 2. 1389 为 10.6。在没有进行培养基及培养条件优化情况下, H2-1 和 J2-2 的油脂得率系数分别为 14.56 和 10.73, 均比较高, 可作为本实验的目的菌株, 进行下一步利用蔗渣半纤维素水解液发酵产油实验。

2.2 油脂酵母 H2-1 和 J2-2 利用蔗渣半纤维素水解液发酵产油实验

将 H2-1 和 J2-2 酵母接种到蔗渣半纤维素水解液发酵培养基中培养 168 h, 发酵结束测定的结果见表 2。

由表 1 和表 2 的摇瓶发酵结果可以看出, H2-1 和 J2-2 利用蔗渣半纤维素水解液发酵产油的油脂得率系数为 13.49 和 10.23, 和利用纯木糖发酵产油的油脂得率系数 14.56 和 10.73 相比, 两者的产物转化率是接近的。但是利用蔗渣半纤维素水解液需要 168 h, 比利用纯木糖的 120 h 要多 48 h。可见 H2-1 和 J2-2 可以比较理想地利用蔗渣半纤维素水解

表 1 木糖油脂发酵
Table 1 Lipids fermentation of xylose

菌株编号 Strain serial number	生物量 Biomass (g/L)	油脂产量 Lipid yield (g/L)	油脂质量分数 Lipid content (% W/W)	油脂得率系数 Lipid coefficient (g/100 g 消耗的底物)
H2-1	12.50	4.867	38.94	14.56
H2-2	20.20	3.434	17.00	8.23
H2-3	4.32	0.415	9.61	1.56
J2-1	4.45	0.712	16.00	2.78
J2-2	16.32	3.788	23.21	10.73
J2-3	6.89	0.943	13.69	3.20
H3-1	6.23	1.595	25.60	4.60
H3-2	8.1	1.994	24.62	7.39
J3-2	18.97	3.472	18.30	6.90
J3-3	10.4	2.548	24.50	6.37

注: 以上结果均为 3 次平均值, 相对误差为 $\pm 2\%$

Note: The above results are all average value of 3 times, the relative errors are all within $\pm 2\%$

表 2 蔗渣半纤维素水解液油脂发酵
Table 2 Lipids fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates

菌株编号 Strain serial number	生物量 Biomass (g/L)	油脂产量 Lipid yield (g/L)	油脂质量分数 Lipid content (% W/W)	油脂得率系数 Lipid coefficient (g/100 g 消耗的底物)
H2-1	11.98	4.420	36.89	13.49
J2-2	15.48	3.480	22.48	10.23

注: 以上结果均为 3 次平均值, 相对误差为 $\pm 2\%$

Note: The above results are all average value of 3 times, the relative errors are all within $\pm 2\%$

液发酵产油。H2-1 和 J2-2 发酵蔗渣半纤维素水解液的过程图, 见图 1 和图 2。

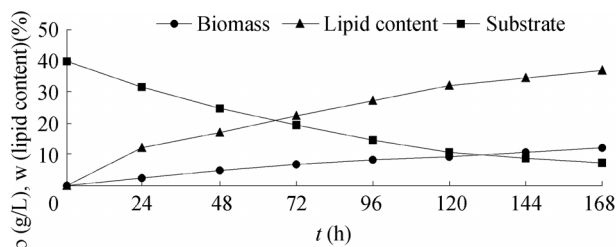


图 1 摇瓶培养下 H2-1 利用蔗渣半纤维素水解液油脂发酵过程菌体生物量、油脂质量分数以及底物变化
Fig. 1 Time courses of biomass, lipid content and substrate consumption during flask culture H2-1 lipid fermentation with sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates

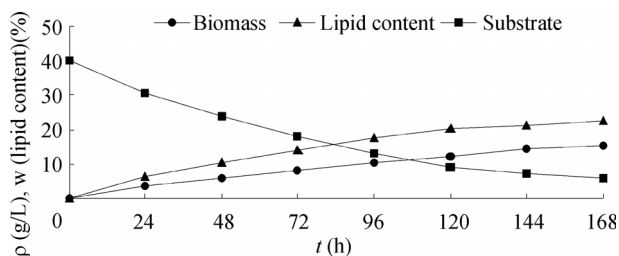


图 2 摇瓶培养下 J2-2 利用蔗渣半纤维素水解液油脂发酵过程菌体生物量、油脂质量分数以及底物变化
Fig. 2 Time courses of biomass, lipid content and substrate consumption during flask culture J2-2 lipid fermentation with sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates

2.3 油脂酵母 H2-1 和 J2-2 的鉴定

2.3.1 油脂酵母 H2-1 和 J2-2 的常规形态和生理生化鉴定: 见表 3 和表 4。

表 3 油脂酵母 H2-1 和 J2-2 的主要生物学特征
Table 3 The biological characteristics of oleaginous yeast H2-1 and J2-2

主要生物学特征 Biological characteristics		H2-1	J2-2
个体形态 Individual form	细胞形态 无性繁殖形式	椭圆形或圆形 多边芽殖	椭圆形或圆形 多边芽殖
培养特征 Cultural characteristics	麦芽汁中 28℃ 培养 3 d	管底有沉淀, 培养液表面有菌环 菌落平坦, 粉红色, 有光泽, 不透明, 边缘整齐平滑	管底有沉淀, 培养液表面有菌环 菌落平坦, 珊瑚红色, 有光泽, 松软湿润, 表面粘稠, 不透明, 边缘整齐平滑
	麦芽汁琼脂培养基 28℃ 培养 7 d		
	马铃薯琼脂培养基加盖片 28℃ 倒置培养 7 d		
	双层马铃薯琼脂培养基 25℃ 倒置培养 21 d	无掷孢子	无掷孢子

表 4 油脂酵母 H2-1 和 J2-2 的生理生长特征
Table 4 The physiological and growth characteristics of oleaginous yeast H2-1 and J2-2

生理生长特征 Physiological and growth characteristics		H2-1	J2-2
生理特征 Physiological characteristics	碳源同化性	同化: D-木糖 不同化: 乳糖、麦芽糖、甘露醇	同化: D-木糖、麦芽糖、甘露醇 不同化: 乳糖
	氮源同化性	同化硝酸钾	同化硝酸钾
生长特征 Growth characteristics	DBB 显色	阳性	阳性
	类淀粉化合物的测定	阴性	阴性
	37℃ 生长	阳性	阳性
	25℃ 生长	阳性	阳性
	50% D-葡萄糖琼脂板	生长	生长
	60% D-葡萄糖琼脂板	生长	生长
	脲酶	阳性	阳性
0.1% 放线菌酮	阴性	阴性	

2.3.2 产油酵母 H2-1 和 J2-2 的 26S rDNA 序列分析: 搜索结果表明, H2-1 号菌的 26S rDNA D1/D2 domains 基因的核酸序列, 与 GenBank 现有 *R. minuta* 的核酸序列的同源性达到 99%。用 Neighbour-joining

方法构建的系统发育树表明 H2-1 亦与 *R. minuta* (AM160643) 进化距离最近, 如图 3 所示。J2-2 号菌的 26S rDNA D1/D2 domains 基因的核酸序列, 与 GenBank 现有 *R. glutinis* 的核酸序列的同源

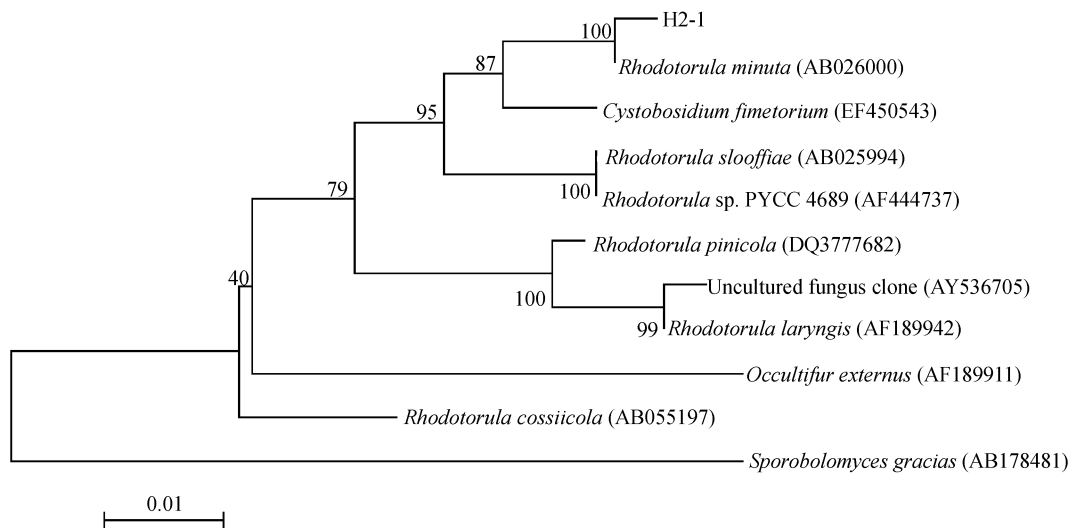


图 3 菌株 H2-1 的系统发育学地位
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain H2-1 and its relatives

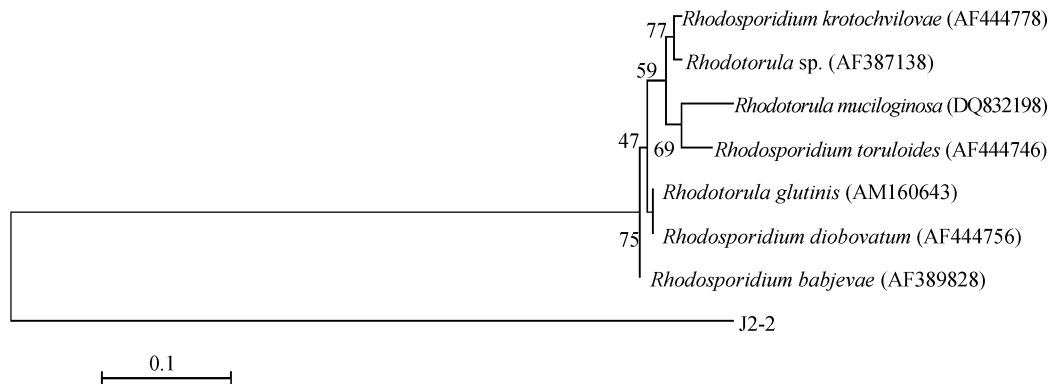


图 4 菌株 J2-2 的系统发育学地位
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain J2-2 and its relatives

性达到 99%。同样用 Neighbour-joining 方法构建的系统发育树表明 J2-2 亦与 *R. glutinis* (AM160643) 进化距离最近, 如图 4 所示。这与常规形态和生理生化鉴定结果所对应的菌株相一致。

2.3.3 产油酵母 H2-1 和 J2-2 的鉴定结果: 根据以上实验结果, 我们将 H2-1 鉴定为小红酵母, J2-2 鉴定为粘红酵母, 都属于半知菌类, 芽孢纲, 隐球酵母目, 红酵母属。

3 讨论

H2-1(*R. minuta*)能很好地利用木糖, 生物量和产油量均比较高, 文献[15]报道*R. minuta*利用葡萄糖产油, 油脂含量达到 45%, 油脂得率系数为 22.5, 其主要由C₁₇-C₁₈饱和脂肪酸组成。J2-2 (*R. glutinis*)

的生物量很高, 虽然没有H2-1 利用木糖油脂得率系数高, 但比H2-1 容易破壁, 有利于油脂的提取。同时据文献报道^[1], 粘红酵母属产油菌株中油脂含量最高的, 能达到 72%, 其脂肪酸组成也主要由C₁₇-C₁₈饱和脂肪酸组成, J2-2 是一株比较有潜力的产油酵母。

在没有经过诱变育种、培养基和培养条件优化的情况下, H2-1 和 J2-2 能比较理想地利用蔗渣半纤维素水解物发酵产油, 油脂得率系数分别为 13.49 和 10.23, 显示了利用蔗渣这种廉价原料生产微生物油脂的潜力。因此, 更加证明了微生物油脂是具有广阔前景的新油脂资源, 不仅降低了生产的成本, 实现了资源的循环再利用, 更重要的是为解决人类面临的油脂危机提供了一条新的开发途径, 因其脂

肪酸组成和植物油相似, 可能在未来生物柴油产业中发挥重要作用, 对我国的经济发展和能源安全具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Ratledge C, Wynn JP. 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** (12): 1647-1656.
- [3] Ratledge C. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production. *Biochimie*, 2004, **86**: 807-815.
- [4] 刘淑君, 杨文博, 施安辉. 高产油脂酵母菌选育及摇瓶发酵条件的研究. *微生物学通报*, 2000, **27**(2): 93-97.
- [5] Marti'n C, Galbe M, Wahlbom CF, *et al.* Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**: 274-282.
- [6] 张厚瑞, 曾健智, 何成新, 等. 酵母发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇. *生物工程学报*, 2002, **18**(6): 724-728.
- [7] 张龙翔. 生化试验方法和技术. 北京: 人民教育出版社, 1980, pp. 68-90.
- [8] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**: 911-917.
- [9] 黄伟坤. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, pp. 53-54.
- [10] 巴尼特 JA[英], 佩恩 RW[美]. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991, pp. 6-20.
- [11] Kurtzman CP. Four new *Candida* species from geographically diverse locations. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, **79**: 353-361.
- [12] 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. *生物加工过程*, 2007, **5**(2): 36-41.
- [13] 施安辉, 谷劲松, 刘淑君, 等. 高产油脂酵母菌株的选育、发酵条件的优化及油脂成分分析. *中国酿造*, 1997, **4**: 10-14.
- [14] 李永红, 刘波, 孙艳, 等. 广谱碳源产油酵母菌的筛选. *中国生物工程杂志*, 2005, **25**(12): 39-44.
- [15] Saxena V, Sharma CD, Bhagat SD, *et al.* Lipid and fatty acid biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *American Oil Chemists' Society*, 1998, **75**: 501-505.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 ~5 不可写成 3~5 ; 3%~6% 不可写成 3~6% 等。

文中的数值和单位之间应加一个空格, 除了%和 。