粘红酵母 GLR_{513} 产油脂条件

施安辉　谷劲松　刘淑君　肖海杰
（山东大学微生物技术国家重点实验室　济南　250100）

当今无论是食用油脂，还是工业用油脂，国内外均非常短缺，寻求新的油脂来源任务迫切。利用微生物生产油脂具有：不受季节和气候的影响；油脂含量高；生产原料来源广泛；生产周期短；油脂中不饱和脂肪酸含量高，可预防、治疗心血管疾病，促进大脑发育，增强机体的免疫能力，利于身心健康。因此，高产油脂菌株的选育及微生物油脂的研究、生产引起了国内外的广泛重视。

本研究的目的在于在已选育获得的 GLR_{513} 的基础上，探索在实验室条件下油脂发酵的最佳工艺条件和油脂中饱和和不饱和脂肪酸的主要成分及含量。

1　材料与方法

1.1　菌种

GLR_{513} 为本室采用 EMS 诱变选育的高产油脂粘红酵母[1~3]

1.2　培养基

YEPD 培养基(%)：葡萄糖 2，酵母浸膏 2，蛋白胨 2，蒸馏水 100ml 配制。麦芽汁固体培养基(制法略)。麦芽汁液体培养基：在液体麦芽汁的基础上加入 2% 蛋白胨。发酵培养基(%)：葡萄糖 4，$(NH_4)_2SO_4$ 0.2，KH_2PO_4 0.7，Na_2SO_4 0.2，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15，酵母浸膏 0.15，pH5.5。

1.3　摇瓶发酵

菌株活化(30℃，培养 3d)后，接种于 50ml 发酵液中，30℃ 于 140r/min 摇床培养 24h 后，移种于 500ml 发酵液中，30℃，140r/min 摇床培养 72h。

1.4　分析方法

1.4.1　菌体干重的测定：培养后的菌体经镜检后，用滤纸过滤，蒸馏水洗 2 次称湿重，取部分湿菌体 60℃ 烘干称重，以确定湿菌体内含水量，所得的湿菌体进行油脂的抽提。

1.4.2　菌体油脂的测定：首先对菌体进行冷冻破壁，把菌体置于 −50℃ 冷冻 12h，取出后用自来水冲洗三角瓶壁，并用力振荡，菌体细胞在温度骤然升高的情况下，细胞的冰粒发生变化，会冲破菌体细胞壁便于油脂的提取，然后置于离心机中(3000r/min)离心 10min，测定上清液中的残糖和残氮，下层沉淀加入 pH0.7 磷酸缓冲液摇匀，再置于滤纸包中。油脂组成分析采用岛津 RLA 气相色谱仪、SP-3700 型色谱仪和 Flnnigan Mat212 型磁质谱仪联谱分析。

1.4.3　菌体油脂的提取：主要参考 Folch 法和索氏提取法。离心获得的菌体包于滤纸中，移入索氏提取器中，用石油醚(60～90℃)反复回流抽提 16h，用滤纸斑点测试，检验是否抽提完全，回收石油醚后 60℃ 烘干，根据瓶抽提前后的重量差，以及滤纸包的重量差，可得菌体的油脂含量。

1.4.4　残糖的测定：采用 Somogyi 法。

1.4.5　蛋白质和无机氮源的测定：采用凯氏定氮法。

收稿日期：1997-03-05，修回日期：1997-10-27。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2 结果与讨论

2.1 粘红酵母 GLR_{513} 在实验室条件下产油脂条件的优化[4~8]

2.1.1 pH 值对 GLR_{513} 菌株生长和油脂产量的影响：对照组发酵过程不调 pH，实验组发酵过程不断用碱回调 pH 值，维持 pH 值在 5.0～5.5 之间。实验结果见表 1。

表 1 发酵过程调节 pH 的变化对菌株生长和产油脂的影响

组分/项目	最初 pH 值	最终 pH 值	油脂含量/%	菌体生物量/mg·ml^{-1}	脂肪系数
对照	5.5	2.0	21.2	6.2	8.76
调节 pH 值后	5.5	5.2	37.9	10.4	14.1

注：脂肪系数：100 克葡萄糖转化为油脂的克数。

实验结果表明，在发酵过程中调节 pH 值，可以大大提高菌体的得率和油脂的产量。

2.1.2 接种量对 GLR_{513} 菌株生长和油脂形成的影响：接种量分别为 10%、20%、30%。实验结果表明以 10% 的接种量最佳，而油脂的产量以 20% 的接种量为最适宜。

2.1.3 温度对菌株生长和油脂形成的影响：实验温度分别为 20、25、30 和 33℃。实验结果表明，30℃ 时菌体细胞生长良好，菌体生物量和油脂产量最高，对底物的利用率也达到高峰。

2.1.4 不同的氮源对菌株生长和油脂形成的影响：分别以 $(NH_4)_2SO_4$、尿素、NH_4Cl、$NaNO_3$、NH_4NO_3、酵母膏和蛋白胨为氮源。每种氮源浓度均为 0.15% + 0.05% 酵母膏，若以酵母膏为唯一氮源时，则浓度为 0.15%。实验结果表明，$(NH_4)_2SO_4$、$NaNO_3$、酵母膏和蛋白胨均为较好氮源，对底物的利用率则以 $(NH_4)_2SO_4$ 为最佳，另外，$(NH_4)_2SO_4$ 成本较低，便于大生产。

2.1.5 碳源对 GLR_{513} 菌株生长和油脂合成的影响：每种碳源浓度均为 3%。实验结果见表 2。

表 2 碳源对 GLR_{513} 菌株生长和油脂合成的影响

碳源	C/N	菌体生物量/mg·ml^{-1}	油脂含量/%	脂肪系数
葡萄糖	32.5	11.4	38.3	14.6
蔗糖	35.6	9.8	31.4	10.3
麦芽糖	35.5	8.9	33.1	9.4
木糖	33.9	4.6	41.4	6.2
可溶性淀粉	32.5	7.6	25.5	9.7

实验结果表明，葡萄糖为最佳碳源，木糖为碳源虽然菌体含油脂量更高，但其菌体生物量和脂肪系数较低，表明对底物利用率较差。

2.1.6 不同的 C/N 对 GLR_{513} 菌株生长和油脂合成的影响：实验结果表明，C/N 比为 70 时，油脂含量、脂肪系数都较高。

2.1.7 培养后期补料对 GLR_{513} 菌株生长和油脂合成的影响：实验结果表明，培养后期补加碳源，菌体生物量和油脂含量均有提高。

综上所述，初步确定粘红酵母 GLR_{513} 的摇瓶培养最佳产油脂条件，葡萄糖为碳源；硫酸铵为氮源；C/N 为 70:1，初始 pH 值为 5.5；发酵过程调节 pH，发酵结束 pH 为 5.2，温度为 30℃；通过后期补加碳源的方式培养 72h，最终油脂产量可达菌体干重的 67.2%。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

2.2 GLR_{513}菌体油脂组成成分分析[9~14]

GLR_{513}菌体的油脂经岛津RIA气相色谱仪、SP-3700型色谱仪和Flnnigan Mat212型磁质谱仪联谱分析，GLR_{513}的菌体油脂中不饱和脂肪酸含量可达56.51%，其中棕榈油酸34.31%，油酸3.80%，亚油酸2.00%，亚麻酸10.20%，二十碳五烯酸(EPA)2.60%，二十二碳六烯酸(DHA)3.60%。

参 考 文 献

1 施安辉，谷劲松，中国酿造，1997，**4**：10～14
2 殷蔚申，食品微生物，北京：中国财政经济出版社，1990，269～273
3 胡瑞卿译．酵母的特征与鉴定手册，青岛：青岛海洋大学出版社，1993
4 徐天宇．食品与发酵工业，1995，**1**：56～65
5 赵人俊．生物工程学报，1995，**11**(4)：361～365
6 Papaparaskevas D, Christkopoulos P, Kekosand D *et al*. Biotechnolog Letters, 1992, **14**(5): 397～40
7 Granger L M, Prlof P, Goma G. Biotechnology and Bioengineering, 1993, **42**(1): 1151～1156
8 Granger L M, Perlof P, Goma G *et al*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, **38**: 784～789
9 Latz. Canada Journal of Microbilolgy, 1990, **36**: 319～326
10 Evans C T, Rafledge C. Journal of General Microbiology, 1984, **130**: 1705～1710
11 Sajbidor J, Certik M, Doboronova S. Biotechnology Letters, 1988, **10**: 347～350
12 Gturcotta N K. Biotechnology Letters, 1988, **11**: 637～642
13 Prapulla S G, Jacob Z, Chand N. Biotechnology and Biotechnology, 1992, **40**: 965～970.
14 Yoon S H, Rhim J W, Choideway S Y *et al*. Journal of Fermentation Technology 1982, **60**: 243～246.

The Research on Option of Lipid Fermentation by *Rhodotorula gutinis* GLR_{513}

Shi Anhui Gu Jinsong Liu Shujun Xiao Haijie

Abstract We utilized the protoplast fusion techinique, ultroviole light and EMS to induce original strain, and got the mutant GLR_{513} next we made research for the best culture conditions for lipid fermentation. The result is the best carbon source is glucose, the best nitrogen source is $(NH_4)_2SO_4$, C: N is 70:1, initial pH is 5.5, and it is necessary to maintain this value during fermentation, the inoculation volume is 20%, optimum temperature is 30℃, fermentation time is 72h, during fermentation more glucose need. At the end of the fermentation, the maximum lipid content 67.2% can be achieved. Analysed with MS and GC, the lipid consists of 56.51% unsaturated fatty acid they are palmitoletic acid 34.3%, oleic acid 3.8%, linoleic acid 2.00%, linolenic acid 10.2%, EPA2.6%, DHA3.6%.

Key words *Rhodotorula glutinis*, fermentation conditions, lipid components

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn