

## 双液相体系强化氧传递促进微生物油脂生产

颜日明<sup>1</sup>, 艾佐佐<sup>1,3</sup>, 汪涯<sup>2</sup>, 张志斌<sup>1</sup>, 曾庆桂<sup>1</sup>, 朱笃<sup>1,2</sup>

1 江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022

2 江西科技师范大学, 江西 南昌 330013

3 江西教育学院理学院, 江西 南昌 330032

颜日明, 艾佐佐, 汪涯, 等. 双液相体系强化氧传递促进微生物油脂生产. 生物工程学报, 2013, 29(4): 536-539.

Yan RM, Ai ZZ, Wang Y, et al. Improved production of microbial lipids in the two-liquid phase fermentation system. Chin J Biotech, 2013, 29(4): 536-539.

**摘要:** 文中通过添加氧载体正十二烷进行双液相发酵来提高发酵性丝孢酵母利用木薯淀粉水解液生产微生物油脂的产量。结果表明, 在摇瓶发酵液中添加氧载体, 能明显缓解发酵过程中的氧限制程度。在 2 L 发酵罐中添加 1% 正十二烷进行双液相高密度发酵, 其发酵生物量和油脂产量分别达到 101.2 g/L 和 50.28 g/L。气相色谱分析表明, 添加了氧载体发酵的微生物油脂中含有更高的饱和脂肪酸含量。

**关键词:** 正十二烷, 氧载体, 双液相发酵, 微生物油脂, 发酵性丝孢酵母

## Improved production of microbial lipids in the two-liquid phase fermentation system

Riming Yan<sup>1</sup>, Zuozuo Ai<sup>1,3</sup>, Ya Wang<sup>2</sup>, Zhibin Zhang<sup>1</sup>, Qinggui Zeng<sup>1</sup>, and Du Zhu<sup>1,2</sup>

1 Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, Jiangxi, China

2 Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

3 School of Science, Jiangxi Institute of Education, Nanchang 330032, Jiangxi, China

**Abstract:** In the present study, we developed a two-liquid phase fermentation system by adding 1% n-dodecane as oxygen-vector to enhance the microbial lipids productivity of *Trichosporon fermentans* using cassava starch hydrolysate. Results suggest that the oxygen-vector could alleviate the oxygen shortage in flask fermentation. The cell mass and lipids concentration were 101.2 g/L and 50.28 respectively in 2 L fermenter with the presence of 1% n-dodecane. Additionally,

**Received:** December 5, 2012; **Accepted:** January 28, 2013

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021205), University Science and Technology Program of Jiangxi Province, Major Academic, Scientific and Technological Pacesetter Research Program of Jiangxi Province (No. 060002).

**Corresponding author:** Du Zhu. Tel: +86-791-88120193; E-mail: zhudu12@163.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA021205), 江西省高等学校科技落地计划, 江西省主要学科学术与技术带头人培养计划 (No. 060002) 资助。

gas chromatography analysis also reveals that the microbial lipids produced by *T. fermentans* contained a higher percentage of saturated fatty acid in the oxygen-vector case.

**Keywords:** n-dodecane, oxygen-vectors, two-liquid phase fermentation system, microbial lipids, *Trichosporon fermentans*

近年来,微生物的油脂发酵生产正成为发展生物柴油产业和生物经济的重要方向<sup>[1]</sup>。木薯作为非粮作物,具有适应性强、生长快、产量大,可生长于山野荒地,不与粮食争地等优点<sup>[2]</sup>,成为发酵生产微生物油脂的良好候选原料。我们在前期已经对利用木薯淀粉水解液发酵生产微生物油脂工艺进行了一些有益的探索,并获得了一些结果<sup>[3-5]</sup>。然而,在发酵过程中我们发现以木薯淀粉作为原料,存在发酵液粘度较大等问题,导致发酵过程中氧传递受限,氧供应的不足使得发酵过程中菌体的生长和油脂的合成受到明显的影响。

利用氧载体 (Oxygen-vector) 提高发酵过程中的氧传递效率是一种目前应用较广泛的方法。刘红等<sup>[6]</sup>发现 5% 正十二烷的添加量可使发酵液最终 L-天冬酰胺酶酶活提高 21% 左右;梁新乐等<sup>[7]</sup>使用豆油作为氧载体可以促进法夫酵母虾青素的合成;Narta 等<sup>[8]</sup>使用 6% 液体石蜡使得 L-天冬酰胺酶活性提高了 34%, 生物量提高了 48%。国内外一些研究表明,不同的发酵产品,其氧载体种类也不尽相同。优良的氧载体能与发酵液形成的双液相发酵体系,可以大大改善氧气传递,提高发酵液中氧气的溶解度,从而提高好氧发酵的产率<sup>[9-13]</sup>。

本文以木薯淀粉水解液为碳源,通过添加正十二烷对发酵性丝孢酵母 *Trichosporon fermentans* 的生长和油脂积累情况进行了研究,以探索正十二烷作为氧载体在提高微生物生产油脂产量中的作用。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 木薯淀粉

木薯淀粉购自广西武鸣县恒星淀粉厂。

#### 1.1.2 发酵菌种

发酵性丝孢酵母 *T. fermentans* F12 菌株经本实验室诱变获得,原始菌株购自中国工业微生物菌种保藏中心 (保藏编号: CICC1368)。

#### 1.1.3 培养基

方法参照文献[4]。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 木薯淀粉水解液的制备

方法参照文献[5]。

#### 1.2.2 生物量的测定

方法参照文献[4]。

#### 1.2.3 培养基氧传递系数 ( $K_La$ ) 的测定

$K_La$  的测定采用 PS6700 型发酵尾气分析仪 (重庆川仪分析仪器有限公司) 在线测定。

#### 1.2.4 微生物油脂的提取

采用索氏提取法<sup>[14]</sup>。

#### 1.2.5 培养条件

摇瓶培养: 方法参照文献[4]。

发酵罐分批补料培养: 采用 2 L 发酵罐 (德国 B. Braun), 初始装液量为 1.2 L, 5% 的接种量, 当残糖浓度低于 20 g/L 时, 开始补加浓度为 600 g/L 的木薯淀粉水解液。培养温度为 28 °C, 通气量 1 vvm, 发酵过程中用 NaOH 溶液调节 pH 不低于 6.0。

#### 1.2.6 脂肪酸成分测定

方法参照文献[4]。

## 2 结果与分析

### 2.1 正十二烷浓度对发酵的影响

我们前期分别考察添加大豆油、油酸、正己烷和正十二烷等氧载体对 *T. fermentans* 的菌体生长和油脂产量的影响, 结果表明正十二烷具有较好的促进作用。为了进一步考察不同浓度的正十二烷对菌

体生长和油脂产量的影响,我们在摇瓶发酵液中分别添加 0.5%、1%、2%和 4% (V/V) 的正十二烷,结果表明,1%的正十二烷添加量有利于细胞的油脂积累,最高油脂含量为 61.93%。

## 2.2 正十二烷在摇瓶发酵中的作用

为了研究氧载体在微生物油脂中的作用,我们通过改变 250 mL 摇瓶的装液量和转速条件来研究正十二烷在 *T. fermentans* 发酵中的作用。结果表明,随着装液量的提高,氧气供应限制程度增加,发酵生物量和油脂含量均明显降低,但添加了 1% 正十二烷的摇瓶比对照的下降幅度要小。同样,在低转速的情况下,正十二烷的添加也可以明显减缓因溶氧不足引起的菌体生长和油脂合成下降程度。这说明,在 *T. fermentans* 发酵生产微生物油脂过程中,氧气的供应水平会影响菌体生长和油脂产量。而添加正十二烷,可以促进氧传递效率,从而有效地缓解氧限制条件下的溶氧不足。

## 2.3 2 L 发酵罐中正十二烷对发酵的影响

我们考察了 *T. fermentans* 在 2 L 发酵罐上进行补料分批高密度发酵,并对过程中 1% 正十二烷添加前后的菌体生长、油脂积累情况进行探索。结果表明,在发酵前期,随着菌体的生长,发酵液中溶氧 (DO) 下降迅速,氧传递系数 ( $K_La$ ) 也伴随着菌体浓度和发酵液粘度的增加而不断下降。从 28 h 开始,通过不断提高搅拌转速,可以明显提高  $K_La$  和 DO 的水平。但随着菌体密度的上升,进一步提高搅拌转速 (52 h),  $K_La$  和 DO 的增加有限,菌体生长速率和油脂合成速率也有所减缓。在不改变转速的情况下,通过添加 1% 正十二烷 (66 h) 进行双液相发酵,  $K_La$  非常显著地增加,比添加氧载体前平均增加了 76%,并且此后一直保持在较高的水平 (图 1A)。这表明,正十二烷的加入能与发酵液形成的双液相体系,增大了氧传递的相面积,从而大大提高了氧的体积传递系数  $K_La$ ,菌体生长速率和油脂合成速率明显增加,在 120 h 时发酵生物量和油脂产量分别达到 101.2 g/L 和 50.28 g/L,单细胞的油脂含量达到 49.68%,比未添加氧载体的对

照批次分别提高了 25.3%、41.8% 和 9.7% (图 1B)。这进一步说明了添加氧载体后,氧的传递效率增加,从而有利于微生物的生长和油脂的合成。

## 2.4 添加正十二烷对油脂脂肪酸成分的影响

为了考察添加氧载体正十二烷对微生物油脂质量的影响,我们对其成分进行了气相色谱分析 (表 1)。结果表明,与对照组相比,添加正十二烷的微生物油脂中饱和脂肪酸的含量 (47.97%) 明显要高于对照组 (38.92%)。这表明氧载体的添加会对细胞的脂肪酸生成产生一定的影响。

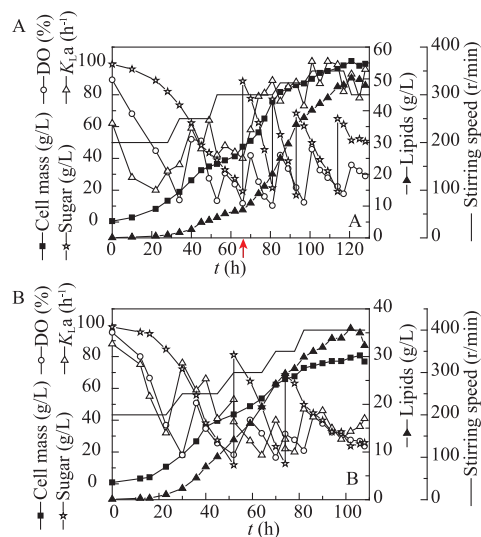


图 1 2 L 发酵罐中添加正十二烷对发酵过程的影响

Fig. 1 Effects of n-dodecane on *T. fermentans* fermentation in 2 L fermenter. (A) Experimental batch with adding 1% n-dodecane, the arrow in x-axis was the time point of adding n-dodecane. (B) Control batch.

## 3 讨论

利用木薯淀粉水解液为基质进行微生物油脂发酵具有较好的应用前景。然而,在发酵过程中普遍存在发酵液粘度大、氧传递效率低等缺点,导致发酵过程中生物量和油脂产量受限,无法满足今后工业化生产要求。因此,有效解决发酵过程中的氧传递问题是实现利用木薯生产微生物油脂工业化的重要途径之一。利用氧载体进行双液相发酵,可

表 1 添加正十二烷对发酵性丝孢酵母油脂成分影响

Table 1 Effects of n-dodecane on microbial lipids components produced from *T. fermentans*

Components	Fatty acid content (%)	
	Control	n-Dodecane
Tetradecanoic acid (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> )	0.15	0.26
Tetradecenoic acid (C <sub>14</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> )	-	0.01
Palmitic acid (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	16.31	20.16
Palmitoleic acid (C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	0.11	0.08
Stearic acid (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	21.05	26.14
Oleic acid (C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> )	54.64	42.72
Linoleic acid (C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	4.95	5.31
Linolenic acid (C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub> )	0.23	0.27
Arachidic acid (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> )	0.91	-
Eicosenoic acid (C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub> )	0.06	0.84
Eicosadienoic acid (C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> )	-	0.29
Arachidonic acid (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	-	0.52
Docosanoic acid (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> )	0.50	0.10
Tetracosanoic acid (C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> )	-	1.31
DHA (C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> )	-	0.30
Others	1.09	1.69

以大大提高氧的传递系数,有利于氧传递,对提高好氧发酵的经济效益具有重要意义。

本文将正十二烷作为氧载体应用于发酵性丝孢酵母微生物油脂发酵的研究中,结果表明,正十二烷的添加能大大缓解 *T. fermentans* 发酵过程中氧限制的程度。在 2 L 发酵罐上添加 1% 正十二烷进行高密度发酵,其生物量和油脂产量分别达到 101.2 g/L 和 50.28 g/L,单细胞的油脂含量达到 49.68%。

## REFERENCES

- [1] Zhao ZB, Hu CM. Progress in bioenergy-oriented microbial lipid technology. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 427-435 (in Chinese).  
赵宗保, 胡翠敏. 能源微生物油脂技术进展. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 427-435.
- [2] Fang J, Pu WH, Zhang HJ. The development status of cassava industry at home and abroad. *Chin Agric Sci Bull*, 2010, 26(16): 353-361 (in Chinese).  
方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况. *中国农学通报*, 2010, 26(16): 353-361.
- [3] Yuan JY, Ai ZZ, Zhu D, et al. Microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* B3 using cassava starch. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 453-460 (in Chinese).  
袁锦云, 艾佐佐, 朱笃, 等. 皮状丝孢酵母 B3 利用木薯淀粉发酵生产微生物油脂. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 453-460.
- [4] Ai ZZ, Yan RM, Yuan JY, et al. Optimazation of single cell oil produced from cassava starch by response surface methodology. *China Biotechnol*, 2012, 32(7): 66-72 (in Chinese).  
艾佐佐, 颜日明, 袁锦云, 等. 响应面法优化木薯淀粉发酵生产单细胞油脂工艺. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(7): 66-72.
- [5] Zhang ZB, Yan RM, Zeng QG, et al. Study on hydrolysis process of cassava starch used for microbial lipid fermentation. *Food ferment ind*, 2012, 38(5): 86-90 (in Chinese).  
张志斌, 颜日明, 曾庆桂, 等. 用于微生物油脂发酵的木薯淀粉水解工艺的优化. *食品与发酵工业*, 2012, 38(5): 86-90.
- [6] Liu H, Wei DZ. Effect of oxygen-vectors on L-asparaginase fermentation. *Chin J Biotech*, 1998, 14(3): 298-302 (in Chinese).  
刘红, 魏东芝. 氧载体对 L-天冬酰胺酶发酵过程影响的研究. *生物工程学报*, 1998, 14(3): 298-302.
- [7] Liang XY, Li JR, Chen M, et al. Application of oxygen vectors to *Phaffia rhodozyma* cultivation for astaxanthin production. *Mycosystema*, 2003, 22(3): 424-429 (in Chinese).  
梁新乐, 励建荣, 陈敏, 等. 氧载体强化氧传递促进法夫酵母虾青素的合成. *菌物系统*, 2003, 22(3): 424-429.
- [8] Narta U, Roy S, Kanwar SS, et al. Improved production of L-asparaginase by *Bacillus brevis* cultivated in the presence of oxygen-vectors. *Bioresour Technol*, 2011, 102(2): 2083-2085.
- [9] Wang JL. Enhancement of citric acid production by *Aspergillus Niger* using n-dodecane as an oxygen-vector. *Process Biochem*, 2000, 35(10): 1079-1083.
- [10] Amaral PFF, Freire MG, Marrucho IM, et al. Optimization of oxygen mass transfer in a multiphase bioreactor with perfluorodecalin as a second liquid phase. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(3): 588-598.
- [11] Pu QK, Wang J, Lin GC. Enhancement of  $\beta$ -carotene production by *Blakeslea trispora* using aqueous-organic two phase system. *China Brew*, 2011, 30(6): 54-57 (in Chinese).  
蒲乾坤, 王婧, 林高超, 等. 利用水-有机两相体系提高三孢布拉霉菌合成  $\beta$ -胡萝卜素水平的研究. *中国酿造*, 2011, 30(6): 54-57.
- [12] Peng C, Huang H, Liu X, et al. Influences of n-hexadecane on *Mortierella alpine* growth and arachidonic acid production. *Food Sci Technol*, 2010, 35(5): 2-5 (in Chinese).  
彭超, 黄和, 刘欣, 等. 添加正十六烷对高山被孢霉发酵生产花生四烯酸的影响. *食品科技*, 2010, 35(5): 2-5.
- [13] Zhu Y, Yuan QP, Wang H. Enhancement of lycopene production by *Blakeslea trispora* using oxygen-vectors and surface active agents. *Microbiol China*, 2006, 33(1): 90-93 (in Chinese).  
朱艳, 袁其朋, 王航. 添加氧载体及表面活性剂对番茄红素发酵的影响. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 90-93.
- [14] Li ZF, Zhang L, Shen XJ, et al. A Comparative study on four method of fungi lipid extraction. *Microbiol China*, 2001, 28(6): 72-75 (in Chinese).  
李植峰, 张玲, 沈晓京, 等. 四种真菌油脂提取方法的比较研究. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 72-75.

(本文责编 陈宏宇)